

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann**

**Der Einfluss von Autoantikörpern gegen Aquaporin 4 bei der Pathogenese der
Neuromyelitis optica**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christoph Ruschil

aus Weiden i. d. Opf.

Würzburg, April 2014



Referentin: Prof. Dr. Claudia Sommer

Korreferentin: Prof. Dr. Anna-Leena Sirén

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2014

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. EINFÜHRUNG UND THEORETISCHE GRUNDLAGEN	1
1.1. Neuromyelitis optica - Klinik und Abgrenzung zur Multiplen Sklerose (MS)	1
1.2. Autoantikörper gegen Aquaporin 4	2
<i>1.2.1. NMO und Autoantikörper</i>	2
<i>1.2.2. Aquaporin 4: Struktur und Verteilungsmuster im ZNS</i>	3
<i>1.2.3. Einfluss von AQP4 auf die zerebrale Wasserhomöostase und Auswirkungen von NMO-IgG</i>	4
<i>1.2.4. Histopathologie der NMO-Läsionen</i>	4
1.3. Mögliche Pathomechanismen der NMO-IgG	6
<i>1.3.1. Komplement-abhängige Zytotoxizität</i>	6
<i>1.3.2. Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität</i>	9
<i>1.3.3. Internalisierung von AQP4</i>	9
<i>1.3.4. Assoziation von AQP4 und EAAT2 und Auswirkungen auf den Glutamat haushalt</i>	10
1.4. Fragestellung und Zielsetzung	12
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Versuchstiere	14
<i>2.1.1. Herkunft und Tierhaltung</i>	14
<i>2.1.2. Verhaltenstestung</i>	14
2.2. Operative Methoden	17
<i>2.2.1. Intrathekale Katheterimplantation</i>	17
<i>2.2.2. Intrazerebrale Injektionen</i>	20
2.3. Versuchsschema	22
<i>2.3.1. Aufbau der Versuchsgruppen</i>	22
<i>2.3.2. Versuchsablauf</i>	25
<i>2.3.3. Einteilung und Versuchsablauf der intrazerebralen Injektionen</i>	26
2.4. MRT-Bildgebung	26
<i>2.4.1. Kontrastmittelgabe</i>	26
<i>2.4.2. MR-Protokoll</i>	27
2.5. Histologie	27
<i>2.5.1. Gewebeentnahme</i>	27
<i>2.5.2. Färbeprotokolle</i>	28
2.6. Quantitative Analyse	33
<i>2.6.1. Aquaporin 4 und Anti-Human IgG</i>	33

2.6.2.	<i>Anti-GFAP-Färbung</i>	34
2.6.3.	<i>EAAT2</i>	35
2.7.	Statistische Auswertung	35
3.	ERGEBNISSE	36
3.1.	Allgemeine Vorbetrachtungen	36
3.1.1.	<i>Keine gruppenspezifischen Auffälligkeiten im Gewichtsverlauf</i>	36
3.1.2.	<i>MRT-Untersuchung ausgewählter Tiere</i>	37
3.1.3.	Definition von Läsionsarealen in der histologischen Aufbereitung	37
3.2.	Auswertung der Gruppen mit Patienten-IgG und zusätzlicher Gabe von aktivem humanem Komplement	41
3.2.1.	<i>Progressive klinische Verschlechterung durch Patienten-IgG + hC</i>	41
3.2.2.	<i>Verhaltenstestung</i>	42
3.2.3.	<i>Komplement-unabhängige Pathogenese auch bei Patienten-IgG</i>	44
3.2.4.	<i>Histologische Aufarbeitung</i>	44
3.3.	Auswertung der Gruppen mit rekombinanten Antikörpern	56
3.3.1.	<i>NMO-Score</i>	56
3.3.2.	<i>Verhaltenstestung</i>	59
3.3.3.	<i>Histologische Auswertung</i>	60
3.4.	Intrazerebrale Injektion von IgG mit aktivem Komplement	69
3.4.1.	<i>Klinische Beobachtung</i>	69
3.4.2.	<i>Histologische Auswertung</i>	69
4.	DISKUSSION	72
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
4.2.	Beurteilung des klinischen NMO-Scores und der Verhaltenstestungen	72
4.3.	Beurteilung der MRT-Bildgebung	76
4.4.	Beurteilung der histologischen Ergebnisse	77
4.4.1.	<i>Beurteilung der Färbungen gegen AQP4 und GFAP</i>	78
4.4.2.	<i>Beurteilung der Färbung gegen EAAT2 und EAAT2-Hypothese</i>	80
4.5.	Beurteilung der Applikation von humanem Komplement und Limitationen des Modells	81
4.6.	Schlussfolgerung und Ausblick	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG	84
6.	LITERATURVERZEICHNIS	85
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94

1. EINFÜHRUNG UND THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1.1. Neuromyelitis optica - Klinik und Abgrenzung zur Multiplen Sklerose (MS)

Erstmals wurde 1870 von T. Allbutt die Assoziation einer Querschnittsmyelitis und Optikusneuritis beschrieben (Allbutt, 1870; Jarius und Wildemann, 2012). Bereits 1895 wurde das Krankheitsbild von dem französischen Neurologen E. Devic als eigenständige Entität eingeordnet und später als Neuromyelitis optica (NMO) bzw. Devic-Syndrom benannt (Devic, 1894; 1895). Dennoch galt die NMO über weite Strecken des 20. Jahrhunderts als Unterform der MS mit schwerem klinischem Verlauf und optico-spinaler Betonung (Jacob et al., 2007). Das Devic-Syndrom wurde klassischerweise als entzündlich-demyelinisierendes Syndrom beschrieben, welches durch gleichzeitiges Auftreten einer beidseitigen Opticusneuritis und akuter Myelitis gekennzeichnet ist (Wingerchuk et al., 1999) und sich in Schweregrad und Verlauf deutlich von der klassischen MS abgrenzt. Während die Erkrankung in Westeuropa eher selten auftritt (Ip und Wiendl, 2008), ist der Anteil der optico-spinalen Form an demyelinisierenden Erkrankungen bei Personen nicht-kaukasischer Herkunft wie Afrikanern und Asiaten deutlich erhöht (Kira, 2003). Im Vergleich zur MS sind Frauen mit einem Verhältnis von 5:1 (Jacob et al., 2007) bis 9:1 (Wingerchuk et al., 2007) deutlich häufiger betroffen, das Alter bei Erkrankungsbeginn liegt mit einem Median von 39 Jahren ebenfalls höher.

Die Erkrankung verläuft meist schubförmig, ein sekundär chronisch-progredienter Verlauf ist anders als bei der MS hingegen eher selten (Wingerchuk et al., 2007). Jedoch sind die Remissionen bei der NMO oft inkomplett, sodass Behinderungen wie Erblindung oder bleibende Paresen, bis hin zu akuter zentraler respiratorischer Insuffizienz, früh im Krankheitsverlauf auftreten (Wingerchuk und Weinshenker, 2003; Jarius et al., 2012). Ein weiterer Unterschied betrifft die MRT-Bildgebung. Zwar können zerebrale Läsionen auftreten, bleiben jedoch meist stumm (Pittock et al., 2006) und entsprechen nicht den MS-Diagnosekriterien nach Barkhof (Barkhof et al., 1997). Für die NMO typisch sind hingegen langstreckige, Gadolinium aufnehmende Läsionen im Bereich des Rückenmarkes, welche sich über mindestens 3 Wirbelsegmente erstrecken und im Gegensatz zu MS-Läsionen vorwiegend zentromedullär gelegen sind (Filippi und Rocca, 2004). Im Liquor findet sich deutlich seltener eine intrathekale IgG-Synthese, im akuten Schub zeigt sich neben aktivierten Lymphozyten ein eher granulozytär und monozytär

dominiertes Zellbild (Wingerchuk et al., 1999; Jarius et al., 2010; Jarius und Wildemann, 2013).

Letztendlich führten histopathologische und serologische Erkenntnisse wie die Entdeckung NMO-spezifischer Autoantikörper (siehe 1.2) dazu, dass die NMO nun als eine von der MS zu unterscheidende Krankheitsentität definiert wird. Nach verschiedenen anderen möglichen Diagnosekriterien (Cree et al., 2002) gelten aktuell die 2006 revidierten Diagnosekriterien nach Wingerchuk (Abb. 1):

<p>obligat:</p> <ul style="list-style-type: none">• Optikusneuritis• Akute Myelitis <p>mindestens 2 von 3 supportiven Kriterien:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Langstreckige zusammenhängende Läsion über ≥ 3 Segmente in der spinalen MRT-Bildgebung2. cMRT bei Erkrankungsbeginn erfüllt nicht die Diagnosekriterien für MS nach Paty (Paty et al., 1988)3. NMO-IgG positiver serologischer Status
--

Abb. 1: Revidierte Diagnosekriterien für Neuromyelitis optica (NMO) (Wingerchuk et al., 2006)

1.2. Autoantikörper gegen Aquaporin 4

1.2.1. NMO und Autoantikörper

2004 wurden in der Arbeitsgruppe von Wanda Lennon erstmalig NMO-spezifische Autoantikörper im Serum beschrieben, welche an piale und subpiale Strukturen sowie an Arteriolen und Kapillaren des Gehirns und Rückenmarks binden (Lennon et al., 2004). Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass diese Antikörperbindung mit den typischen Orten der Aquaporin 4-Expression korreliert und spezifisch an mit Aquaporin 4 (AQP4) transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) bindet (Lennon et al., 2005). In einem Radioimmunoprecipitation-Assay (RIPA) zeigten Anti-AQP4-Antikörper eine Spezifität von $>98\%$ für NMO (Paul et al., 2007), in einem modifizierten Ansatz mit AQP4-transgenen HEK-293 Zellen lag die Sensitivität bei 91%, die Spezifität sogar bei 100% (Takahashi et al., 2007). Weitere klinische Studien zeigen eine Korrelation zwischen Antikörpertiter und klinischem Verlauf (Jarius et al., 2008;

Weinstock-Guttman et al., 2008), ein Befund, der eine kausale Rolle dieser Antikörper nahelegt. Dafür lassen sich auch das klinische Ansprechen von NMO-Patienten auf eine Plasmapherese im akuten Schub (Wingerchuk et al., 1999; Lennon et al., 2004; Watanabe et al., 2007) und die hochwirksame Therapie mit dem B-Zell-depletierenden monoklonalen Antikörper Rituximab (Jacob et al., 2008; Bedi et al., 2011; Ip et al., 2013) aufführen.

1.2.2. Aquaporin 4: Struktur und Verteilungsmuster im ZNS

AQP4 ist der am weitesten verbreitete Wasserkanal im menschlichen Gehirn (Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003) (Abb. 2). Es gehört zur Familie der Aquaporine, einer Gruppe aus kleinen (ca. 30 kDa/Monomer), den Wasserhaushalt regulierenden, hydrophoben integralen Membranproteinen (Verkman, 2005). Die beiden durch alternative Transkription entstandenen Isoformen von AQP4, eine M1-Form mit einer Länge von 301 Aminosäuren und eine M23-Form mit 323 Aminosäuren (Jung et al., 1994; Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003), lagern sich in

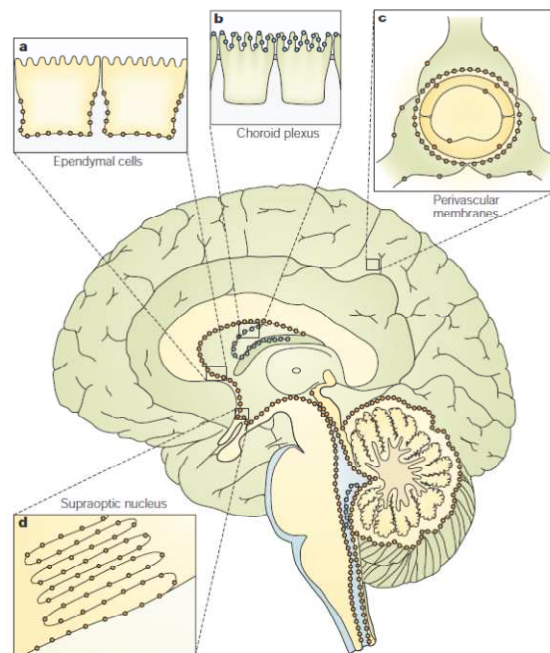


Abb. 2: Verteilung von AQP1 (blaue Kreise) und AQP4 (orange Kreise) im Gehirn (aus Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003)

Heterotetrameren zusammen (Neely et al., 1999), welche kleine „intramembrane particles“ (IMP) oder bis zu 3 MDa große „orthogonal arrays of particles“ (OAP) formen (Nicchia et al., 2008; Nicchia et al., 2009). Der NMO-assoziierte Antikörper ist vom IgG1-Subtyp (Hinson et al., 2007) und bindet an die M1- wie auch die M23-Isoformen von Aquaporin (Crane et al., 2009; Crane et al., 2011).

Außer an Astroglia im Gehirn und Rückenmark (Jung et al., 1994) wird AQP4 auch in Skelettmuskel, Niere, Lunge, Innenohr und Magen exprimiert (Graber et al., 2008). AQP4 wird nur in supportiven Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) wie Astrozyten und Ependymzellen, nicht jedoch an Neuronen oder Oligodendrozyten ge-

funden (Tait et al., 2008). Es wird in besonderer Weise an Grenzonen zwischen Hirnparenchym und Flüssigkeitskompartimenten gebildet. So zeigt sich im Gehirn und im Rückenmark an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bzw. an der Gehirn-Liquor-Schranke eine hohe AQP4-Dichte an den perikapillären und subpialen Endfüßchen der Astrozyten (Nielsen et al., 1997; Rash et al., 1998; Tait et al., 2008; Papadopoulos und Verkman, 2013).

1.2.3. Einfluss von AQP4 auf die zerebrale Wasserhomöostase und Auswirkungen von NMO-IgG

Eine der Hauptfunktionen des AQP4-Kanals besteht in der Regulation des Wasserhaushaltes und der Blut-Hirn-Schranke (BHS) (Papadopoulos und Verkman, 2013). So zeigen AQP4-defiziente Mäuse ein deutlich vermindertes toxisch bedingtes Gehirnödem (Verkman et al., 2006) und nach traumatischen Rückenmarksverletzungen reduzierte periläsionelle Ödeme (Saadoun et al., 2008). Die Auswirkungen von Antikörpern gegen AQP4 auf die Wasserhomöostase werden kontrovers beurteilt. Bei anti-AQP4-Antikörper-positiven Patienten wurden radiologische Hinweise auf Störungen der Wasserhomöostase der BHS in Form ausgeprägter periläsioneller Ödeme beschrieben. (Matsushita et al., 2009). Während einige Arbeitsgruppen auch in vitro eine alterierte Wasserhomöostase fanden (Hinson et al., 2012), konnten andere die These, dass NMO-assoziierte AQP4-Antikörper die osmotische Funktion des Wasserkanals beeinträchtigen, nicht bestätigen (Nicchia et al., 2009; Rossi et al., 2012). Weitere Arbeitsgruppen zeigten in einem In-vitro-Modell der BHS mit fetalen humanen Astrozyten, dass sich durch NMO-IgG das Verteilungsmuster von AQP4 nach intrazellulär verschiebt und eine erhöhte Permeabilität der BHS stattfindet (Vincent et al., 2008). Eine weitere Studie belegt, dass Patientenserum von NMO-IgG positiven Patienten in einem Zellmodell die BHS stören kann. Allerdings machen die Autoren nicht anti-AQP4-Antikörper allein, sondern im Serum enthaltene Zytokine wie VEGF (vascular endothelial growth factor) für diese Störung verantwortlich (Shimizu et al., 2012).

1.2.4. Histopathologie der NMO-Läsionen

In Autopsiestudien von NMO-Patienten findet man sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz Stellen ausgeprägter perivaskulärer entzündlicher Läsionen, welche

mit Hohlrumbildung, Nekrosen, axonalen Schäden und einem Verlust an Oligodendrozyten assoziiert sind. Dort zeigt sich ebenfalls eine ausgeprägte Infiltration mit Makrophagen, Mikrogliazellen und eosinophilen Granulozyten. In frühen Erkrankungsstadien kommt es an den typischen Läsionsstellen zu Ablagerungen von Immunglobulinen und aktivierten Komplementfragmenten (Lucchinetti et al., 2002) sowie deutlich verdickten Wänden nahegelegener Gefäße (Misu et al., 2006). Insbesondere an Orten wie Rückenmark, Hirnstamm oder der Area postrema, welche beim Gesunden eine hohe AQP4-Dichte aufweisen, treten „Läsionen“ auf, in welchen keinerlei AQP4-Expression mehr nachweisbar ist und es stattdessen zu einer Infiltration von Eosinophilen und Plasmazellen sowie Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement kommt (Roemer et al., 2007).

Anhand dieser Befunde wurden in Autopsiestudien verschiedene Läsionstypen und -stadien im Rückenmark beschrieben (Misu et al., 2007; Parratt und Prineas, 2010). In der derzeit aktuellsten wurden 6 histopathologisch unterscheidbare Läsionstypen klassifiziert (Misu et al., 2013), welche zwei verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen zuzuordnen sind:

Einerseits zeigen die Läsionstypen 1-3 eine durch astrozytäre Ablagerung von Immunglobulinen und aktiviertem Komplement getriggerte Pathologie (Typ 1, "aktive NMO-Läsion, assoziiert mit Komplementaktivierung und Granulozyteninfiltration"), welche in "zystischen Läsionen mit extensiver Gewebeerstörung" (Typ 2) mit vollständigem AQP1- und AQP4-Verlust resultiert. In deren Folge bleiben "Läsionen mit Ähnlichkeit zu sekundärer Waller'schen Degeneration" (Typ 3), charakterisiert durch Myelinverlust bei reaktiver Gliose und variablem AQP4-Verlust zurück. Der zweite Läsionstyp (4-6) scheint nicht durch aktiviertes Komplement und Granulozyten bedingt zu sein. Einer nahe aktiven Läsionen gelegenen "Läsion mit selektivem AQP4-Verlust ohne weitere strukturelle Schädigungen" (Typ 4) folgt eine "aktive NMO-Läsion mit astrozytärer Clasmatodendrosis" (Typ 5), gekennzeichnet durch eine charakteristische Anhäufung bizarrer Astrozyten mit massiv vergrößertem perinukleärem Zytoplasma, intrazytoplasmatischen Vakuolen und Einziehungen, Aufreihen und Verklumpung von Zellfortsätzen und möglicher Endozytose von AQP4. Die "Läsionen mit astrozytärer Dystro-

phie und primärer Demyelinisierung" (Typ 6) werden als Folge der initialen Astrozyten-Schädigung interpretiert.

Eine weitere Autopsiestudie von 6 NMO-Patienten (Saji et al., 2013) bestätigt astrozytäre Nekrosen und einen Verlust von AQP4- und GFAP-positiven Zellen in inflammatorisch demyelinisierenden Läsionen im Rückenmark. Im Kortex kommt es trotz fehlender Hinweise auf Komplementablagerungen in der Lamina I zu einem hochgradigen Verlust an AQP4-Expressivität der Astrozyten. Die Anzahl der GFAP-positiven Astrozyten ist zwar reduziert, jedoch gibt es dort ebenfalls AQP4-negative, GFAP-positive, nicht-lytische Astrozyten. In den Schichten II-IV bleibt die AQP4-Expression erhalten, es zeigt sich sogar eine Vermehrung an GFAP-positiven Strukturen. Auffallend ist, dass in den Laminae II, III und IV eine signifikante Verringerung in der Dichte der kortikalen Neurone beschrieben wird, darüber hinaus auch für die Lamina II eine große Anzahl aktivierter Mikroglia. Diese Befunde eines nicht Komplement-abhängigen selektiven Verlusts der AQP4-Expression ohne konsekutive Astrozyten-destruktion könnte einen Hinweis auf einen weiteren Antikörper-induzierten Mechanismus ohne Komplementaktivierung darstellen. Die Autoren führen eine mögliche inkomplette Internalisierung in Folge der Bindung des NMO-IgG-Komplexes mit konsekutiver Störung der Wasser- oder Glutamat-Homöostase als mögliche Erklärung an. Der Verlust an kortikalen Neuronen in benachbarten Regionen könnte auf andere Mechanismen wie die Beteiligung von Mikroglia hinweisen.

1.3. Mögliche Pathomechanismen der NMO-IgG

1.3.1. Komplement-abhängige Zytotoxizität

1.3.1.1. Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist sowohl selbstständiger Bestandteil der angeborenen Immunität als auch Effektoranteil der Antikörperantwort des adaptiven Immunsystems. Es besteht aus 35 bis 40 Proteinen und Glykoproteinen im Plasma oder auf Zelloberflächen (Carroll und Sim, 2011), welche miteinander interagieren, um Krankheitserreger zu opsonisieren und eine Entzündungsreaktion zur Infektabwehr auszulösen. Die Komple-

mentkaskade kann auf drei Wegen ausgelöst werden, dem „klassischen“ Weg, dem Lektinweg und dem alternativen Weg.

Beim klassischen Weg kommt es durch die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes aus einem planaren pentameren IgM-Molekül oder mindestens 2 in enger sterischer Nähe gelegenen IgG-Molekülen mit einem Zielantigen zur Bindung von C1q an die Fc-Abschnitte der Immunglobuline und zur konsekutiven enzymatischen Aktivierung von C1r. Über verschiedene Zwischenschritte (C4, C2, C3-Konvertase) wird das Peptidfragment C5b freigesetzt, welches die Bildung des terminalen Membranangreifenden Komplexes (bestehend aus C5b, C6, C7, C8 sowie 10-16 C9-Molekülen) auslöst. Letzterer ist ein Transmembrankanal, welcher die Homöostase der Zelle durchbricht und zur Zerstörung der Zielzelle führt [nach (Murphy, 2012), Kapitel 2 und 10].

1.3.1.2. Komplementaktivierung als pathogene Ursache bei Autoimmunerkrankungen

Neben den physiologischen Aufgaben bei der Bekämpfung von Bakterien und der Lyse nekrotischer Zellen wird eine pathologische Beteiligung von Komplement auch bei einer Vielzahl von Erkrankungen diskutiert. Das Spektrum reicht hierbei von Abstoßungsreaktionen von Transplantaten über degenerative Erkrankungen wie Alzheimer bis hin zu Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis, membranproliferativer Glomerulonephritis, Pemphigus vulgaris oder Myasthenia gravis (Morgan und Harris, 2003).

Aufgrund des Vorhandenseins spezifischer IgG-Autoantikörper und der Autopsiebefunde mit Nachweis von aktiviertem Komplement und Zelldestruktion liegt es nahe, dass Komplement auch bei der NMO eine Rolle spielt. Die Freisetzung von C3a und C5a Fragmenten erhöht die Permeabilität von Gefäßwänden und die Bindung von C3b erleichtert die Phagozytose. Letztendlich baut C5a auch einen chemotaktischen Gradienten auf, um Entzündungszellen anzuziehen. Dies alles kann zu der ausgeprägten Leukozyteninfiltration beitragen, welche für NMO-Läsionen charakteristisch ist (Hinson et al., 2010). Astrozyten tragen zwar anders als z. B. Oligodendrozyten des N. opticus (Gasque und Morgan, 1996) das Komplement-regulierende Protein CD59, welches die Bildung des membranangreifenden Komplexes behindern soll, jedoch besteht

für Astrozyten kein Schutz gegen die Folgen einer Aktivierung früher Bestandteile der Komplementkaskade (Spiller et al., 1996). Da der Schweregrad eines NMO-Schubes mit dem Grad der Komplementaktivierung von NMO-IgG zu korrelieren scheint (Hinson et al., 2009), könnte eine mögliche Blockade der Komplementwirkung einen Therapieansatz darstellen. Bei Applikation von C1-Inhibitor wurde in experimentellen Studien keine Entstehung von Läsionen beobachtet (Saadoun et al., 2010), auch in klinischen Pilotstudien zeigte Eculizumab, ein monoklonaler, C5-depletierender therapeutischer Antikörper, eine gute Wirksamkeit bei Patienten mit NMO (Pittock et al., 2013).

Auch direkte experimentelle Befunde unterstreichen die Rolle von Komplement bei der Entstehung sog. typischer NMO-Läsionen:

In Astrozytenkulturen kommt es in Anwesenheit von NMO-IgG zur Zellyse. Hitze- (und somit Komplement-) inaktiviertes Patientenserum reicht alleine jedoch hierfür nicht aus (Kinoshita et al., 2009). Ein ähnlicher Befund konnte auch an kultivierten Rückenmarksschnitten gezeigt werden (Zhang et al., 2011). Auch rekombinante Antikörper (rAb) gegen AQP4 alleine zeigen gemeinsam mit humanem Komplement NMO-typische Läsionen einschließlich Verlust von GFAP und AQP4 sowie Demyelinisierung. In systemischen Passiv-Transfer-Experimenten mit Induktion einer EAE (experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis) zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke führen sowohl aufgereinigtes Patienten-IgG (Kinoshita et al., 2009) als auch rAb gegen AQP4 (Bennett et al., 2009) zu Astrozyten-Depletionen und Ablagerungen von Komplement an den Läsionsstellen. In diesen Experimenten wird jedoch die Blut-Hirn-Schranke durch eine unphysiologische Entzündungsreaktion geöffnet (Bradl et al., 2009). Eine neue Studie zeigt, dass ohne EAE die Blut-Hirn-Schranke bei systemischer Applikation der IgGs weitgehend intakt bleibt und nur Orte einer natürlichen Durchgängigkeit wie die Area postrema von NMO-typischen Läsionen befallen sind (Ratelade et al., 2011).

In einem anderen Tiermodell wurden den Versuchstieren NMO-Seren direkt ins Hirnparenchym injiziert (Saadoun et al., 2010). Hier konnte auch *in vivo* der Nachweis erbracht werden, dass humanes Komplement notwendig ist, um einen Astrozytenuntergang mit Verlust von GFAP und AQP4 und nachfolgender Demyelinisierung zu erreichen.

1.3.2. Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Neutrophile (Saadoun et al., 2012) und eosinophile Granulozyten (Kinoshita et al., 2010), Makrophagen und NK-Zellen genauso wie lösliche Zytokine wie TNF α , IL-6, IL-1 β oder IFN- γ scheinen in einem experimentellen Modell mit vitalen Rückenmarksnerven in der Lage zu sein, zu einer Exazerbation der durch anti-AQP4-Antikörper induzierten Läsionen beizutragen (Zhang et al., 2011). Insbesondere NK-Zellen könnten über den Mechanismus der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) eine entscheidende Rolle spielen. Unter ADCC versteht man das selektive Abtöten von Zellen, deren Oberfläche mit Antikörpern besetzt ist, durch Zellen mit Fc-Rezeptoren, die die konstante Region der gebundenen Antikörper erkennen. Zumeist wird die ADCC durch NK-Zellen vermittelt, welche den Fc-Rezeptor Fc γ RIII oder CD16 haben (Murphy, 2012). Die NK-Zellen, deren Funktion am besten in der Frühphase der Immunabwehr bei Infektionen und in der Tumortherapie untersucht sind, setzen nach Aktivierung zytotoxische Granula frei, welche Granzyme und Perforin enthalten und in der Zielzelle die Apoptose induzieren.

Sowohl in Astrozytenkulturen als auch in einem In-vivo-Modell ist NMO-IgG zusammen mit NK-Zellen in der Lage, Astrozyten zu schädigen. Darüber hinaus sind NK-Zellen in der Lage, durch NMO-IgG und Komplement bedingte Läsionen hochgradig zu verstärken (Ratelade et al., 2012). Zwar werden NK-Zellen in NMO-Läsionen nicht in großem Ausmaß gefunden, da sie jedoch nur eine sehr kurze Lebenszeit haben und zudem andere ADCC-kompetente Immunzellen wie Granulozyten und Eosinophile in NMO-Läsionen übermäßig stark vertreten sind, ist eine Beteiligung dieses Effektorwegs zusätzlich zur Komplement-vermittelten Schädigung wahrscheinlich.

1.3.3. Internalisierung von AQP4

Zusätzlich zur Aktivierung von sekundären Effektorwegen durch Autoantikörper sind bei humoral vermittelten Erkrankungen häufig auch direkte Wechselwirkungen der pathogenen Antikörper mit dem Zielepitop oder der Zielzelle relevant, wie z. B. bei der Pathogenese der Myasthenia gravis (Toyka et al., 1975) oder des Guillain-Barré-Syndroms (Buchwald et al., 2002)

Es wurde gezeigt, dass NMO-IgG selektiv an mit AQP4-transfizierte HEK-293-Zellen (Lennon et al., 2005) bindet und zu einer raschen endosomalen Internalisierung und zu einem Abbau von AQP4 führt (Hinson et al., 2007). Als möglicher Trigger wurde eine bivalente IgG-Bindung an zwei benachbarte AQP4-Moleküle angeführt (Hinson et al., 2010). Diese Herabregulierung könnte mit den Ergebnissen in pathologischen Befunden von Patienten übereinstimmen, welche auch einen von Gewebedestruktion unabhängigen Verlust von AQP4 zeigen (Roemer et al., 2007; Misu et al., 2013). In der Arbeitsgruppe von Wanda Lennon wurde auch eine schnelle Internalisierung von AQP4 in primären Astrozyten nach Applikation von NMO-IgG berichtet (Hinson et al., 2008; Hinson et al., 2012), eine andere Arbeitsgruppe fand dagegen keine Belege für eine Antikörper-induzierte Internalisierung von AQP4 in primären Astrozyten und im Tiermodell nach intrazerebraler Injektion der Antikörper (Ratelade et al., 2011), sodass diese Hypothese weiterhin umstritten bleibt.

1.3.4. Assoziation von AQP4 und EAAT2 und Auswirkungen auf den Glutamat-haushalt

Ausgehend von einer Koexpression von AQP4 und des Na⁺-abhängigen exzitatorischen Aminosäuren-Transporters 2 (EAAT2, homolog dem GLT-1 Kanal in Nagern) in Astrozyten (Nielsen et al., 1997) sowie einer Verminderung des Glutamataufnahme in AQP4-defizienten Mäusen wurde in Analogie auch eine Assoziation von EAAT2 und AQP4 im humanen ZNS postuliert (Zeng et al., 2007; Hinson et al., 2008). In transfizierten Zellkulturen sowie in primären Astrozyten bilden AQP4 und EAAT2 einen makromolekularen Komplex und in Anwesenheit von NMO-IgG kommt es in vitro zu einer simultanen Herabregulierung beider Membranproteine, möglicherweise durch Internalisierung (Hinson et al., 2008).

EAAT2 ist der häufigste Glutamattransporter des Gehirns und für ca. 90% der Glutamataufnahme verantwortlich. Durch Herabregulierung kann es zu einer Störung der Glutathomöostase und zu einer konsekutiven Übererregung der postsynaptischen neuronalen Glutamatrezeptoren, einer Elektrolytverschiebung u. a. der Ca²⁺ und Na⁺-Spiegel und letztendlich einem Untergang von Neuronen kommen (Kim et al., 2011).

Weitere In-vitro-Modelle bestätigen in Anwesenheit von NMO-IgG eine Schädigung benachbarter Oligodendrozyten (Marignier et al., 2010). Da diese selbst kein AQP4 exprimieren, jedoch sensibel auf erhöhte Glutamatspiegel reagieren (Matute et al., 1997; Xu et al., 2008), wird dies in Anbetracht gleichzeitig gemessener erhöhter extrazellulärer Glutamatspiegel als Folge eines „toxischen Bystander-Effekts“ gewertet, in welchem die Oligodendrozyten passiv als Folge des gestörten Glutamatshaushalts der Astrozyten geschädigt werden.

In einem weiteren Experiment mit primären Astrozyten zeigt sich jedoch in Gegenwart von NMO-IgG nur eine geringe Internalisation von AQP4 und kein Hinweis auf eine Internalisation von EAAT2 (Ratelade et al., 2011). Die Autoren argumentieren, dass eine mögliche Erhöhung des Glutamatspiegels und der somit verbundenen toxischen Wirkungen weniger durch eine Reduzierung des EAAT2-Transporters, sondern durch eine allgemeine Nekrose und Störung der Astrozyten zu erklären sei.

In der Zusammenschau der bislang bestehenden Erkenntnisse und der aktuell verfügbaren neuropathologischen Untersuchungen bleibt diese interessante Hypothese einer Antikörper-spezifischen und Komplement-unabhängigen Pathophysiologie ebenso wie die selektive Herabregulierung von AQP4 in intakten Astrozyten (siehe 1.3.3) Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Diskussion.

1.4. Fragestellung und Zielsetzung

Um eine pathophysiologische Rolle von Autoantikörpern im Sinne einer Autoimmunerkrankung zu belegen, ist gemäß den Postulaten von Witebsky (Witebsky et al., 1957; Rose und Bona, 1993) neben Indizien wie dem Ansprechen auf Immunsuppression und der Isolation von Autoantikörpern mit spezifischem Antigen oder autoreaktiven T-Zellen auch der Nachweis der Übertragbarkeit in einem Tiermodell notwendig. Hierbei wird gefordert, dass der Erkrankung ähnliche Merkmale reproduziert werden können, entweder in Form eines direkten Beleges durch Transfer aufgereinigter Immunglobuline oder durch Immunisierung mit dem entsprechenden Antigen.

Die bisher publizierten Tiermodelle sind zumeist Ko-Transfer-Modelle unter Verwendung der sog. experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). So konnte gezeigt werden, dass es in gegen Myelin-basisches Protein (MBP) immunisierten EAE-Modellen (Bennett et al., 2009; Kinoshita et al., 2009) und in mit MBP-reaktiven T-Zellen transferierten EAE-Tieren (Bradl et al., 2009) durch Patienten-Immunglobuline oder rekombinante Antikörper im proinflammatorischen Milieu zu einer Exazerbation der durch die EAE ausgelösten Symptome sowie histopathologische Veränderungen einschließlich eines Verlustes von AQP4- und GFAP-Immunoreaktivität, Ablagerung von Komplement und massive inflammatorische Infiltration kommt. Systemisch applizierte Immunglobuline können die Bluthirnschranke nicht überwinden und erreichen nur zirkumventrikuläre Organe wie die Area postrema (Ratelade et al., 2011). Bei diesen Versuchen mit Zuhilfenahme des EAE-Modells bleibt aufgrund der hierdurch hervorgerufenen inflammatorischen Veränderungen eine Beurteilung des davon getrennten Effekts der NMO-IgG problematisch.

In einem weiteren Tiermodell wurden Versuchstieren Antikörper und humanes Komplement (Saadoun et al., 2010) sowie rekombinante Antikörper in Verbindung mit NK-Zellen oder Komplement direkt intrazerebral injiziert (Ratelade et al., 2012). Diese Versuche deuteten bei hoher lokaler Konzentration auf eine Komplement-abhängige, möglicherweise auch durch NK-Zellen verstärkte Depletion von AQP4 und GFAP hin. Die intraparenchymale Injektion entspricht allerdings nicht den Gegebenheiten und typischen Verteilungsmustern der Krankheit, sodass dieses Modell ebenfalls als problematisch anzusehen ist. Bei beiden Modellen wird der Pathomechanismus vorwiegend his-

tologisch beurteilt, mögliche phänotypische Veränderungen im Verhalten und der Zeitverlauf können hierbei nicht beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe eines weiteren etablierten Passiv-Transfer-Tiermodells mittels repetitiver intrathekaler Injektion durch implantierte Katheter (Yaksh und Rudy, 1976; Geis et al., 2011; Geis et al., 2012) der Einfluss von Autoantikörpern und humanem Komplement bei der Pathogenese der NMO untersucht werden. In zuvor durchgeführten Versuchen unserer Arbeitsgruppe (Ritter, 2013) konnte NMO-Patientenmaterial in diesem Passiv-Transfer-Modell eingesetzt werden und gezeigt werden, dass es bei intrathekaler Applikation von aufgereinigtem Patienten-IgG zu klinischen Erkrankungszeichen in der Verhaltenstestung kommt. Histologisch wurde im Rückenmark eine Reduktion der AQP4- und EAAT2-Reaktivität bei Hypertrophie GFAP-positiver Astrozyten beobachtet.

Die vorliegende Arbeit hat zwei übergeordnete Ziele: zum einen soll untersucht werden, ob die zuvor gewonnenen Erkenntnisse einer Komplement-unabhängigen pathophysiologischen Rolle von aufgereinigtem polyklonalem IgG von NMO-Patienten tatsächlich auf die Wirkung von Antikörpern gegen AQP4 zurückzuführen sind. Hierzu werden spezifische, rekombinante Antikörper gegen AQP4 im intrathekalen Passiv-Transfer-Modell eingesetzt, die aus humanen Plasmazellen gewonnen wurden (Bennett et al., 2009). Zum anderen soll die Rolle von humanem Komplement in diesem Passiv-Transfer-Modell mit polyklonalem NMO-IgG und rekombinanten Antikörpern gegen AQP4 untersucht werden.

Das Verhalten der Versuchstiere und der Krankheitsverlauf sollen mit verschiedenen standardisierten Methoden analysiert werden, darüber hinaus erfolgen bei ausgewählten Tieren Untersuchungen des Rückenmarks im MRT mit dem sensitiven Kontrastmittel Gadofluorin M (Bendszus et al., 2008). Nach Abschluss der Versuche wird eine Gewebentnahme des Rückenmarks und eine detaillierte histologische Aufbereitung und Analyse vorgenommen. Zum Vergleich der Komplement-Wirkung mit anderen bereits publizierten Modellen wird eine intrazerebrale Injektion einer aufgereinigten IgG-Fraktion mit humanem Komplement durchgeführt und histologisch aufgearbeitet.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Herkunft und Tierhaltung

Für die Experimente wurden 6 - 8 Wochen alte weibliche Lewis-Ratten (Charles River Inc. Germany, Sulzfeld, Deutschland) verwendet, welche ein Gewicht von 170 - 230 g aufwiesen.

Die Tiere wurden je nach Anforderungen des Versuchs einzeln in Käfigen Typ III oder zu fünf im Typ IV Eurostandard auf Standardstreu bei einem hell/dunkel Lichtrhythmus von 12/12 Stunden und 55% Luftfeuchtigkeit bei 22°C gehalten. Trockenfutter (Typ 1324; Firma Altromin GmbH & CO.KG, Lage, Deutschland) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Versorgung der Tiere war durch Tierpfleger der Tierhaltung (Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg) gewährleistet.

Die Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken zugelassen (Genehmigung vom 20.01.2010)

2.1.2. Verhaltenstestung

Sämtliche Verhaltenstestungen erfolgten durch mehrere, voneinander unabhängige Untersucher, die in Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit der Tiere verblindet waren.

2.1.2.1. Allgemeine Betrachtung

Während der Versuchsphase wurde der Zustand der Tiere täglich beobachtet, d. h. es wurde das Gewicht erhoben sowie auf äußere Veränderungen wie struppiges Fell, verschmutzte oder verklebte Körperöffnungen oder Schmerzlaute der Ratten beim Ergreifen geachtet. Eine Evaluation der motorischen Fertigkeiten der Tiere bei Bewegung auf freier Fläche und Klettern über Hindernisse ermöglichte abschließend die Einteilung in einen klinischen Punktescore (NMO-Score, siehe Tabelle 1: NMO-Score). Videoaufnahmen ausgewählter Tiere vor Versuchsende oder bei Auftreten klinischer Besonderheiten dienten der Veranschaulichung und Dokumentation.

2.1.2.2. NMO-Score

Die Tiere wurden täglich einzeln auf einen freien Tisch gesetzt und auf Erkrankungszeichen hin untersucht und dabei nach einem Punktescore von 0 - 10 (siehe Tabelle 1: NMO-Score) bewertet. Dieser wurde angepasst nach dem sog. EAN-Score (Experimentelle Autoimmun-Neuritis) nach Hartung et al. (1988). Der Unterschied hierzu ist, dass aufgrund der rückenmarknahen Applikation der Antikörper auch andere Extremitäten erste Krankheitssymptome zeigen können und eine Schwanzlähmung nicht als erstes Symptom auftreten muss.

Tabelle 1: NMO-Score (modifizierter EAN-Score)

Score	Klinische Erkrankungszeichen
0	normal
1	läuft normal, proximale 2/3 des Schwanzes waagrecht, Schwanzspitze schleift auf Boden oder leichte Parese einer Extremität
2	läuft normal, gesamter Schwanz schleift auf Boden oder moderate Parese einer Extremität (kein Wegklappen der Extremität)
3	zusätzlich etwas breitbeiniger Gang, geringe Ataxie
4	breitbeiniger ataktischer Gang, Hinterbeine nicht mehr ganz durchgestreckt, hinten tiefer als bei 3
5	zusätzlich klappt beim Laufen öfter oder immer ein Hinter- oder Vorderbein nach hinten weg, kann jedoch wieder vollständig nach vorne gebracht werden für den nächsten Schritt
6	eine Extremität konstant hinten, kann für den Schritt nicht mehr unter den Körper gebracht werden, oder zwei Extremitäten inkonstant hinten, können noch unter den Körper gezogen werden, oder seitliches Wegrutschen beider Beine, Gang im Spagat
7	zwei Extremitäten (zumeist die Hinterbeine) fast vollständig oder vollständig gelähmt, können nicht mehr bis zur Spagatstellung vorgezogen werden (schwere Parese oder Paraplegie)
8	Schwäche aller vier Extremitäten, zieht sich nicht mehr gerade und flott mit den Vorderbeinen voran, Aufstützen des Oberkörpers nicht mehr nur auf die Pfoten (Tetraparese)
9	Tetraparese und Atemnot; moribund
10	gestorben

2.1.2.3. Rotarod-Testung

Der Rotarod-Test (Abb. 3) ist eine gängige, etablierte Methode, um die motorische Koordinationsfähigkeit und Ausdauer von Versuchstieren bei forcierter Lokomotion zu überprüfen. Dabei sitzen bis zu vier Tiere blickdicht voneinander getrennt auf einem rotierenden Drehstab (Durchmesser 60 mm, Breite je Messplatz 85 mm). Die Zeitnahme wird bei Beginn der Rotation gestartet und durch eine Lichtschranke angehalten, wenn das Versuchstier die Rolle verlässt. Das verwendete Gerät (Rotarod Advanced für 4 Ratten, V 4.0.1, TSE Systems GmbH; Bad Homburg, Deutschland) beschleunigt konstant innerhalb von 300 Sekunden von 5 rpm (Umdrehungen pro Minute) auf 30 rpm.

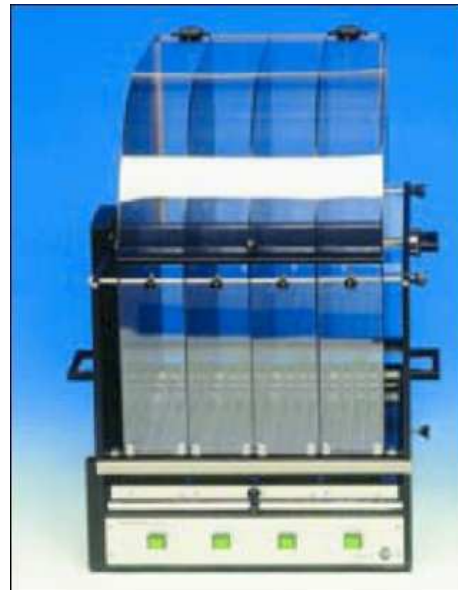


Abb. 3: Aufbau Rotarod

Die Lewis-Ratten wurden eine Woche nach der Operation zunächst in 2 Durchgängen an die Apparatur gewöhnt, ehe an 3 aufeinanderfolgenden Tagen die Baseline-Testungen durchgeführt wurden, um stabile Ausgangsparameter zu erheben. Anschließend wurden die Tiere einmal wöchentlich getestet. Um eine möglichst geringe Beeinflussung der Leistung durch mögliche Reizungen durch die intrathekalen Applikationen zu gewährleisten, erfolgten die Tests in der Regel am zweiten Tag der Pause (48 h nach der letzten Injektion). Um möglichst zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, fanden je Testdurchgang 5 - 6 Messungen pro Tier statt. Aus den 3 höchsten Werten wurde ein Mittelwert gebildet, welcher in die weiteren Auswertungen einging.

2.1.2.4. Grip-Strength-Testung

Der Grip-Strength-Test ist ein bewährtes Verfahren um die Muskel- und Haltekraft der Vorderpfoten festzustellen. Hierbei wird das Versuchstier auf ein mit der Testapparatur verbundenes Gitter gesetzt und am Schwanz gerade nach hinten weggezogen. Der Sensor misst die Kraft, bei welcher die Ratte das Gitter loslässt. Das verwendete Gerät (TSE Grip Strength Meter, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) ist in der

Lage, Kräfte bis zu 2000 g zu messen und speichert sowohl die Loslass- als auch die maximal wirksame Kraft.

Es wurden 10 - 14 Tage nach der Operation je 2 Baseline-Testungen durchgeführt, um stabile Ausgangswerte zu erhalten und danach jeweils eine pro Woche im Anschluss an die Rotarod-Testungen. Pro Durchgang wurden ca. 10 Messwerte erhoben. Dabei war darauf zu achten, dass die Ratten sich jeweils festhielten und kooperierten. Anschließend wurde aus den jeweils 5 besten Resultaten ein Mittelwert errechnet und für die weiteren Auswertungen verwendet.

2.2. Operative Methoden

2.2.1. Intrathekale Katheterimplantation

2.2.1.1. Narkoseführung

Für die Implantation der intrathekalen Katheter wurde ein Isofluran-Sauerstoffgemisch verwendet. Isofluran (IsofluranCP®, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland) wurde hierzu in einen Verdampfer (Vapor 19.3, Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland) gefüllt, in welchem das Gas mit Sauerstoff (O₂-flow 0.4 l/min) vermischt und über einen Plastikschlauch mit 3-Wege-Hahn entweder in eine Narkosekammer (Büchner Sonderanfertigungen; Würzburg, Deutschland) oder eine Narkosemaske (Eigenherstellung) geleitet werden konnte. Ein konstanter Vakuum-Sog über einen zweiten Plastikschlauch eliminierte überschüssige Narkosegase.

Zur Narkoseeinleitung wurde die Ratte in die Kammer gesetzt, in die so lange 4-Vol-%-Isofluran-Sauerstoff-Gemisch geleitet wurde, bis Korneal- und Fußreflexe nicht mehr auslösbar waren. Anschließend wurde das Tier mit der Schnauze in der Maske platziert und die Narkose nach der ersten Inzision unter konstanter Kontrolle von Atemtiefe, Vigilanz und Reflexstatus mit 2 - 2.5 Vol-% des Isofluran-Sauerstoff-Gemischs fortgesetzt.

Nach Beendigung des operativen Eingriffs wurde die Ratte aus der Maske herausgenommen und bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins in einen leeren Käfig auf eine Wärmeplatte (Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland) bei 37°C gesetzt.

2.2.1.2. Auswahl und Herstellung der Katheter

Ein 13 cm langes Stück eines Polyethan-Katheters (PE-10, Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm; BD Intramedic polyethylen tubing, Clay Adams, USA) diente als Ausgangsmaterial für die Katheter. Mit einem Überhandknoten wurde dieser je nach Versuch in ein 6.5 - 7.0 cm Teilstück und ein entsprechendes Reststück unterteilt. Der lose Knoten wurde mit einem Tropfen Hoffmann's Phosphat Zement (Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Deutschland) fixiert. Nach einer Durchgängigkeitsprüfung mit einer NaCl-Testinjektion erfolgte bis zur Implantation mindestens 24 h lang die Desinfektion in einer 70% Ethanollösung.

2.2.1.3. Operative Durchführung

Die intrathekale Katheterimplantation erfolgte ausschließlich an 6 bis 8 Wochen alten weiblichen Lewis-Ratten mit einem Gewicht von 170 - 250 g.

Nach der Narkoseeinleitung wurde das Tier kurzfristig aus der Kammer entfernt und im Nackenbereich beginnend zwischen den Ohren 2 cm nach kaudal rasiert (Ermila 3000, Wahl Deutschland GmbH, Fernwald, Deutschland). Anschließend wurde die Schnauze in der Narkosemaske platziert und das Versuchstier in einen stereotaktischen Rahmen (Sonderanfertigung, Würzburg) eingespannt. Nach Desinfektion des Nackenbereichs mit 70%iger Ethanollösung wurden die Augen mit Bepanthen®-Augensalbe vor Austrocknung geschützt, wobei gleichzeitig der Cornealreflex und somit eine suffiziente Narkosetiefe überprüft werden konnte.

Mit einem Skalpell (Größe 10) wurde in der Mittellinie, zwischen den Ohren beginnend, ein 2 - 2.5 cm langer sagittaler Hautschnitt kaudalwärts durchgeführt. Nun konnte der Fluss des Inhalationsnarkotikums wie oben beschrieben auf 2 Vol.% gedrosselt werden. Nach abermaliger Verifizierung der adäquaten Narkosetiefe per erloschenem Schmerzreflex der Hinterpfote des Versuchstiers wurde die oberflächliche Nackenmuskulatur mit einem kleinen Skalpell (Größe 15) am Occiput durchtrennt und mit einem

am Fußende des sterotaktischen Rahmens befestigten Wundhaken etwa 1 cm nach kaudal gezogen. Jetzt ließ sich der tiefer gelegene Anteil der zweigeteilten Muskelschicht am Ansatz des Hinterhauptes je 3 mm lang, von der Mittellinie ausgehend, in beide Richtungen nach lateral durchtrennen. Die verbliebenen Muskelfasern wurden sorgfältig in kaudale Richtung vom okzipitalen Schädelknochen abgeschabt, sodass anschließend die Dura mater zwischen Schädel und erstem Wirbelkörper freipräpariert werden konnte. Um diese und lokale Blutgefäße zu schonen, erfolgte die Arbeit unter mikroskopischer Sicht (M3Z Surgery microscope, Wild, Heerbrugg, Schweiz).

Anschließend wurde die Dura vorsichtig mit einer 2 mm von der Spitze aus um 90° zu einem Haken verformten 30G Nadel punktiert, bis Liquor austrat. Der Katheter mit dem 6.5 -7.0 cm langen Teilstück voran wurde mittig und parallel zum Hirnstamm durch das vorhandene Loch in das Liquorkompartiment eingeführt und langsam nach kaudal vorgeschoben. Um Reizungen der dorsalen Nervenwurzeln zu minimieren, wurde der Katheter bei Auftreten von Zuckungen der paravertebralen Muskulatur oder eines geringen Widerstandes beim Vorwärtsführen ca. 0.5 - 1.0 cm zurückgezogen, seitlich rotiert und erneut vorgeschoben, bis das Katheterteilstück vollständig im Liquorkompartiment eingebracht war und der Zementknoten locker auf der Dura auflag. Der Zugang wurde anschließend mit nicht resorbierbarem Fadenmaterial, z. B. Silikam 4/0 Braun DS19 B (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland), mit einer Tabakbeutelnaht unter der Nackenmuskulatur fixiert.

Anschließend wurde das freie Ende mit Hilfe einer 20G-Nadel subkutan nach frontal getunnelt, sodass die Austrittsstelle medial ca. 0.5 - 1.0 cm oberhalb der Augen lag. 3 - 4 Einzelknopfnähte, z. B. mit einem resorbierbaren Vicryl 4/0 TF-plus Faden (Ethicon, Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland), verschlossen den Hautschnitt.

Um die Bildung von Blutgerinnseln im Katheter durch akzidentiell bei der Implantation verletzte Gefäße zu verhindern, wurde der Katheter mit Hilfe einer Hamilton-Spritze (Hamilton Microliter Syringes, Model 710-80601 TLL; Postnova Analytics GmbH, Landsberg/Lech, Deutschland) mit 10 µl NaCl gespült und anschließend durch ein 1 cm langes Stück chirurgischen 28G Stahldraht (Surgeal steel B&S DS 28; Ethicon, Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland) reversibel verschlossen.

Nach Beendigung der Narkose wurde das Tier aus dem stereotaktischen Rahmen entfernt und bis zur Wiedererlangung des Bewusstseins und der Schutzreflexe in einen leeren Käfig auf einer Wärmeplatte bei 37°C gebracht.

2.2.1.4. Durchführung der Injektionen

Nach einer Erholungsphase von 10 - 14 Tagen erfolgten die täglichen Injektionen mit einer 100µl-Hamilton-Spritze. Im Anschluss an die Erhebung von Gewicht und NMO-Score wurden die Versuchstiere vom Kopf abwärts in ein Tuch gewickelt, der Stahl-Stopfen der Spitze mit einer Pinzette vorsichtig entfernt und die Injektionsmenge langsam (ca. 10 µl/min) appliziert, wobei stets auf das Verhalten der Tiere und eventuelle Schmerzsignale zu achten war. Bei Schmerzäußerungen wurde die Applikation gestoppt und nach einer Erholungsphase wieder verlangsamt aufgenommen. Zum Abschluss wurde mit 10 µl 0.9% NaCl nachgespült und der Stopfen wieder aufgesetzt.

Die Spritzen wurden in 70% Ethanollösung gelagert und vor jeder Injektion mehrfach mit 0.9% NaCl-Lösung durchgespült.

2.2.2. *Intrazerebrale Injektionen*

2.2.2.1. Narkoseführung

Die Lewis-Ratten wurden mit einer Ketamin-Xylazin-Narkose (80 mg/kg, bzw. 8 mg/kg KG) intraperitoneal anästhesiert. (0.1 ml/100g KG bei einem Verhältnis Ketamin (Ketanest 10%): Xylazin (Rompun 2%): Aqua dest. = 4:1:3). Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch ausgefallene Corneal- und Schmerzreflexe konnten die Versuchstiere auf einem stereotaktischen Rahmen (Sonderanfertigung) 3-Punkt-fixiert werden. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe einer rektal eingeführten Sonde und eines Wärmepads konstant auf 37 - 38°C gehalten, die Augen mit Hilfe einer Bepanthen®-Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt.

2.2.2.2. Operative Durchführung und Injektion

Nach Eintritt der gewünschten Narkostiefe wurde das Fell der Versuchstiere mit einem Rasierapparat (Ermila 3000, Wahl Deutschland GmbH, Fernwald, Deutschland) am Kopf entfernt, anschließend wurden Bregma und Lambda durch einen medianen sagittalen Hautschnitt freigelegt, Faszien und Muskelreste mit einem Skalpell vom knöchernen Schädel abpräpariert.

Die Ratten wurden nun in den stereotaktischen Rahmen gespannt und die Injektionsstellen mit Hilfe eines stereotaktischen Feinmanipulators wie folgt bestimmt (Koordinaten anterior/lateral/Tiefe, in mm, ausgehend vom Bregma, vgl. Abb. 4)

Putamen: (-1/3/5)

Cortex: (-2/5/3)

Stammganglien: (-5/2/6).

Mit einem Mehrzweckbohrer (Dremel 300-1/55; Dremel Deutschland, Leinfelden-

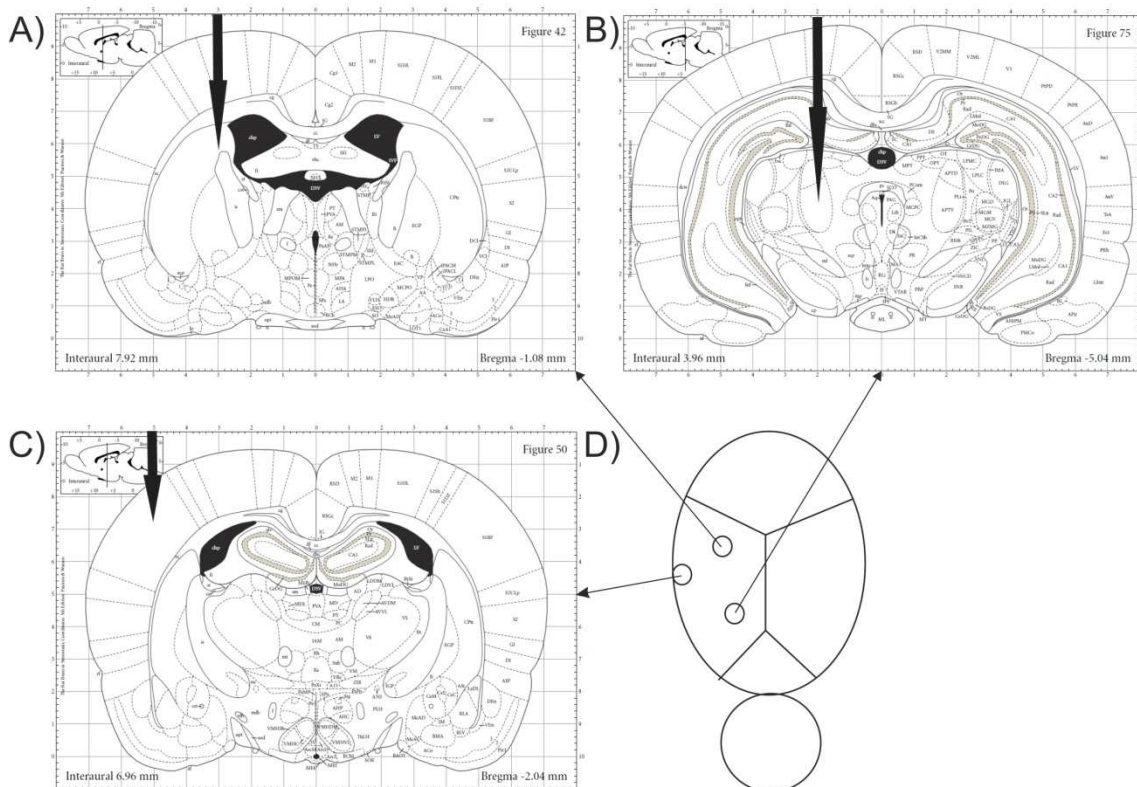


Abb. 4 Darstellung der Lage der Koordinaten der intrazerebralen Injektionen, A) Putamen (-1/3/5), B) Stammganglien (-5/2/6), C) Cortex (-2/5/3), D) Übersicht

Echterdingen, Deutschland, Bohrkopfgröße 11 mm) wurde an obigen Koordinaten ein Loch in den knöchernen Schädel gebohrt, ohne die darunterliegende Dura mater und das Gehirngewebe zu verletzen. Nun konnte mit einem Mikromanipulator eine mit einer 30G Nadel versehene 100 µl-Hamiltonspritze, welche mit einem Injektor (Quintessential Stereotaxic Injector (QSI)TM, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) verbunden war, an die entsprechenden Koordinaten geführt werden.

Die Injektionsgeschwindigkeit lag bei 2 µl/min, bei 5 µl Gesamtvolumen. Im Anschluss wurde die Nadel zurückgezogen und der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten mit einem Vicryl 3/0 TF-plus Faden (Ethicon, Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Für repetitive Injektionen genügte es, die Hautnaht mit einem Skalpell erneut zu öffnen und an den entsprechenden Koordinaten einen erneuten Injektionsvorgang wie beschrieben durchzuführen.

2.3. Versuchsschema

2.3.1. Aufbau der Versuchsgruppen

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Versuchsgruppen. Dabei wurden aufgereinigte polyklonale IgG-Fraktionen von anti-AQP4-IgG positiven NMO-Patienten (Gruppen 1 - 5), IgG-Fraktionen von Kontrollpatienten mit einer chronisch inflammatorischen Polyneuritis (CIDP), aber ohne ZNS-Erkrankung (Gruppen 6, 7) sowie rekombinante Antikörper (Gruppen 8 - 15) verwendet. Bei einem Teil der Versuche erfolgte neben dem Einsatz von Antikörpern auch der von humanem Komplement (hC) (Gruppen 2 - 7, 9 - 11, 15).

Das Patienten-IgG stammte aus therapeutischen Plasmapheresebehandlungen und die IgG-Fraktionen wurden im Labor der neurologischen Klinik nach etablierten Verfahren aufgereinigt (Sommer et al., 2005; Geis et al., 2010; Geis et al., 2011).

Gruppe	Serum/Antikörper	Injektionen	Anzahl Ratten
Patientenseren			
1	NMO 1	9	7
2	NMO 1 + hC	9	7
3	NMO 2 + hC	15	8
4	NMO 3 + hC	15	8
5	NMO 4 + hC	17	10
6	Kontrolle 1 + hC	15	9
7	Kontrolle 2 + hC	15	9
rekombinante Antikörper			
8	rAb ^{Kontrolle1}	15	10
9	rAb ^{Kontrolle1} + hC	12	7
10	rAb ^{Kontrolle2} + hC	12	6
11	rAb ^{AQP4} + hC	12	7
12	rAb ^{AQP4} [0,5mg/ml]	15	7
13	rAb ^{AQP4} [1mg/ml]	13	7
14	rAb ^{AQP4_non_compl}	15	7
15	rAb ^{AQP4_non_compl} + hC	15	7

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der intrathekalen Injektionsversuche, Anzahl der Injektionen, Anzahl der Versuchstiere. Pro Injektionstag wurden 10 µl Serum (+10 µl hC) +10 µl NaCl appliziert

Die rekombinanten Antikörper wurden von Professor Jeffrey L. Bennett (Denver, Colorado, USA) in Kooperation zur Verfügung gestellt und waren bereits in anderen experimentellen Studien validiert. Für die rekombinanten anti-AQP4-Antikörper waren aus CD138+ Plasmazellen aus dem Liquor NMO-IgG positiver Patienten nach etablierten Methoden (Yu et al., 2006; Owens et al., 2007) HEK293-immortalisierte Klone hergestellt worden (Bennett et al., 2009). Die aufgereinigten IgG1-Fractionen (rAb^{AQP4}, ON07-5-53) binden spezifisch mit hoher Affinität (Tradtrantip et al., 2011) und vermutlich monovalent (Crane et al., 2011) an ein konformationelles Epitop (Yu et al., 2011) sowohl der M23- und der M1-Isoform von AQP4 bei Mensch, Ratte und Maus (Crane et al., 2009; Ratelade et al., 2011) und wurden in unseren Versuchen in Konzentrationen von 1 mg/ml und 0.5 mg/ml verwendet. Um die Rolle der Komplementaktivierung zu untersuchen, stand eine Mutante dieses Antikörpers (Ab^{AQP4_non_compl}, ON07-5-53-K332A) zur Verfügung, bei welcher durch eine Punktmutation im F_c-Teil des rAb^{AQP4}-Antikörpers die Fähigkeit zur Komplementaktivierung unterbunden, die Bindungsfähigkeit an AQP4 jedoch nicht beeinflusst wird (Tradtrantip et al., 2011; Ratelade et al., 2012). Als Kontrolle dienten ein Masern-spezifischer rekombinanter Antikörper [rAb^{Kontrolle1}, 2B4, (Burgoon et al., 1999)] sowie ein gegen humanes AQP4 spezifischer, jedoch nicht mit murinem oder Ratten-AQP4 reaktiver rekombinanter Antikörper [rAb^{Kontrolle2}, ON07-7-43 (Bennett et al., 2009)]

Zusammenfassend hatten die rAb folgende Antigen-Spezifitäten und Eigenschaften:

rAb^{Kontrolle1}: Masern-spezifischer rekombinanter Antikörper, Kontrollserum

rAb^{Kontrolle2}: nicht Ratten- oder Maus-AQP4-reaktiver rekombinanter Antikörper

rAb^{AQP4}: AQP4-spezifischer rekombinanter Antikörper

rAb^{AQP4_non_compl}: rAb^{AQP4} mit nicht-Komplement-aktivierendem F_c-Teil

Die Herstellung des **humanen Komplements** (hC) aus Blutserum erfolgte selbstständig. Dafür wurde einem gesunden Probanden Blut entnommen, dieses für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis das Blut geronnen war und anschließend 15 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert, in 300 µl Aliquotes aufgeteilt und in Glasröhrchen unmittelbar bei -80°C eingefroren. Vor jeder Injektion wurde ein Aliquot bei RT aufgetaut, gut durchgemischt, auf Eis gekühlt gelagert und inner-

halb einer Stunde nach Auftauen den Tieren injiziert. Derart behandeltes Serum behält Komplementaktivität (Saadoun et al., 2010), was auch in Proben durch ein externes Labor (MVZ Labor Prof. Seelig, Karlsruhe, Deutschland) bestätigt wurde.

2.3.2. *Versuchsablauf*

Nach erfolgreicher Implantation der intrathekalen Katheter erhielten die Versuchstiere eine 7 - 10-tägige Erholungsphase. Anschließend wurden die Tiere für 2 Tage an die Rotarod-Testungen gewöhnt, ehe an 2 - 3 Tagen jeweils stabile Ausgangswerte der Laufleistungen ermittelt sowie der Grip-Strength-Test durchgeführt wurden. Danach erfolgte die randomisierte Einteilung der Versuchstiere entsprechend ihren Laufleistungen und dem klinischen Erscheinungsbild (siehe 2.3.1). Die Injektionsphasen waren in Zyklen von 5 Injektionstagen, gefolgt von 2 Tagen Pause eingeteilt und erstreckten sich über

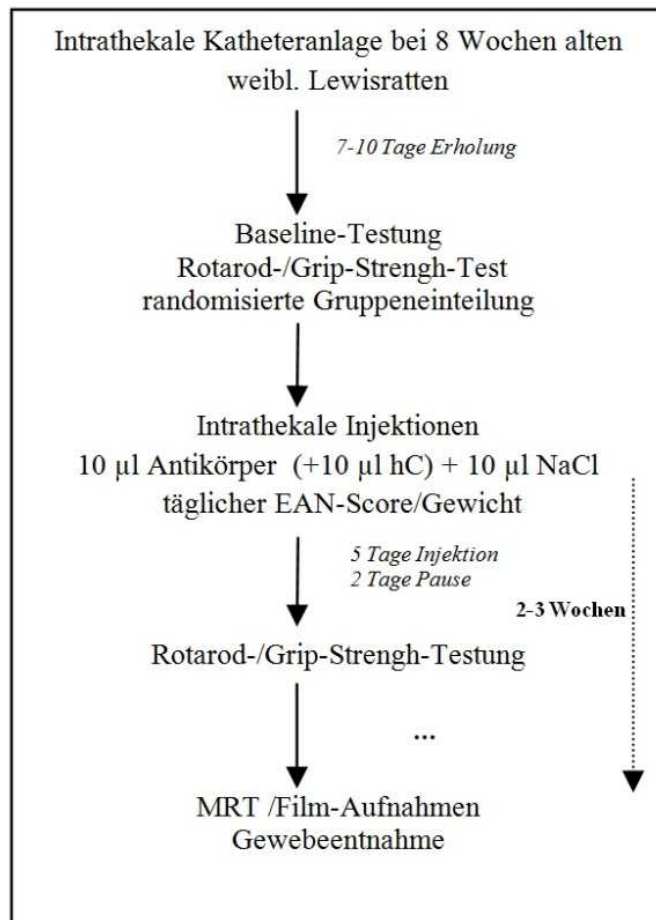


Abb. 5: Injektionsschema Katheterversuche

einen Zeitraum von mindestens 2 - 3 Wochen (Abb. 5). Der klinische NMO-Score wurde täglich erhoben, die Rotarod-Messung erfolgte einmal wöchentlich nach der zweitägigen Injektionspause. Exemplarisch wurden in der letzten Versuchswoche MRT-Untersuchungen und Filmaufnahmen der Tiere gemacht. Die Gewebeentnahme erfolgte 1 - 4 Tage nach der letzten Injektion.

2.3.3. Einteilung und Versuchsablauf der intrazerebralen Injektionen

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Gruppeneinteilung der intrazerebralen Injektionsversuche. Den Versuchsgruppen A 1 - 3 wurden die Seren wie in 2.2.2 beschrieben einmalig appliziert und 24 h später das Gewebe entnommen. Die Versuchsgruppen B 1 - 3 erhielten intrazerebrale Injektionen an den Tagen 0, 2 und 4, die Gewebeentnahme erfolgte an Tag 7.

Gruppe	Serum/Antikörper	Injektionen	Anzahl Ratten
Teil A: Injektion an Tag 0, Entnahme nach 24h			
A1	NMO 2 + hC	1	2
A2	NMO 2	1	2
A3	Kontrolle 1	1	1
Teil B: Injektion an Tag 0/2/4, Entnahme nach 7 Tagen			
B1	NMO 2 +hC	3	3
B2	NMO 2	3	3
B3	Kontrolle 1	3	2

Tabelle 3: Gruppeneinteilung intrazerebrale Injektionsversuche, pro Injektion wurde den Tieren 15 µl Serum (+15 µl hC) [5 (+5) µl pro Bohrloch] mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 µl/min appliziert.

2.4. MRT-Bildgebung

2.4.1. Kontrastmittelgabe

Ausgewählte Versuchstiere erhielten 24 h vor Durchführung der Bildgebung 100 µl GadoSpinF (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) in die Schwanzvene appliziert, entsprechend 25 µmol Gadolinium/kg Körpergewicht.

Es wurden aus den Versuchsgruppen rAb^{Kontrolle2} + hC, rAb^{AQP4} + hC, rAb^{AQP4_non_compl} + hC, rAb^{AQP4_non_compl}, rAb^{AQP4} [0,5mg/ml], rAb^{AQP4} [1mg/ml] und rAb^{Kontrolle1}) jeweils mehrere Tiere untersucht.

2.4.2. MR-Protokoll

Für die Magnetresonanz-Bildgebung (Abb. 6) wurde ein Siemens TIM Trio 3 Tesla Scanner mit einer 7 cm großen Empfängerspule (Siemens) benutzt. Nach einem triplanaren flash localizer wurden die axialen, T1 gewichteten Serien für die genaue Planung verwendet. Anatomische, T1 gewichtete Turbo-spin-echo Sequenzen (TR/TE 860 ms/15 ms, Schichtdicke 1 mm, Matrix 256x256, FOV

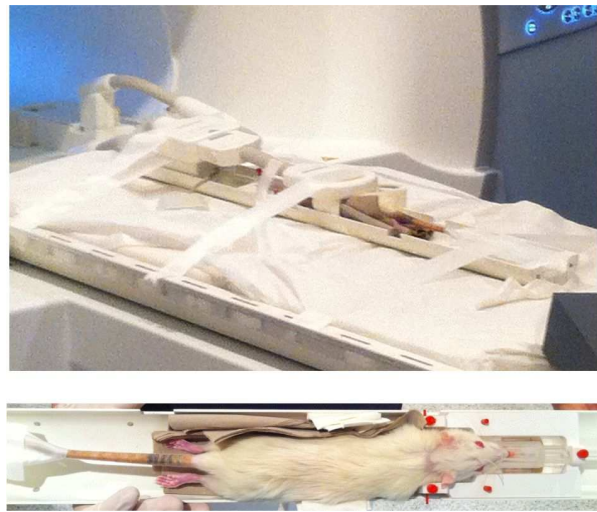


Abb. 6: Exemplarische Lage eines Versuchstieres im MRT

80 mm, 6 Schichten) wurden in der sagittalen Ebene parallel zum Rückenmark mit einer Absättigung der ventral gelegenen Strukturen aufgenommen. Aufgrund der limitierten Größe der Empfängerspule erfolgte die Abbildung des Rückenmarks in 2 Schritten (kranial/thorakaler und lumbaler Anteil). Ausgedehnte Läsionen wurden zusätzlich in der koronaren Ebene dargestellt (TR/TE 860 ms/15 ms, Schichtdicke 1,5 mm, Matrix 256x256, FOV 80 mm, 6 Schichten).

2.5. Histologie

2.5.1. Gewebeentnahme

Nach Beendigung des Experiments wurden die Tiere in Pentobarbitalnarkose (0,5 - 0,6 ml einer Verdünnung Narcoren 160 g/100 ml : 0.9%NaCl = 9:1, Effektivdosis 50 mg/kg KG) anästhesiert und anschließend durch Entbluten getötet, um das Rückenmark, beide Sehnerven sowie das Großhirn zu entnehmen.

In kleinen Einbetttschälchen (Cryomold, Miles Inc., Elkhart, USA) mit Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura, Zoeterwonde, Niederlande) wurde das Gewebe in 2-Methylbutan (Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) in flüssigem Stickstoff abgekühlt und eingefroren. Die Lagerung bis zur Verarbeitung erfolgte bei -80°C .

Die ober- bzw. unterhalb des Katheterendes liegenden Abschnitte des Spinalmarks wurden als thorakales, bzw. lumbales Rückenmark konserviert (siehe Abb. 7).

Vom Großhirn wurden ebenfalls 2 transversale Scheiben (3 mm Dicke) mit Tissue-Tec eingebettet, darüber hinaus wurde der zervikale Abschnitt des Rückenmarks sowie der frontale Großhirnabschnitt nativ entnommen und in 2-Methylbutan auf -80°C gekühlt.

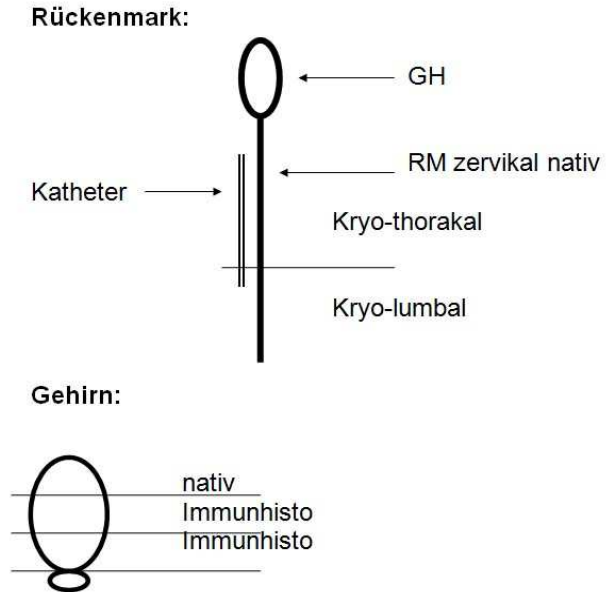


Abb. 7: schematische Darstellung der Gewebentnahme; RM = Rückenmark, GH = Gehirn

Bei den intrazerebralen Injektionen beschränkte sich die Entnahme auf 2 transversale Scheiben des Großhirns entsprechend den Injektionsstellen (3 mm Dicke).

2.5.2. Färbeprotokolle

Für die histologischen Färbungen des Rückenmarks wurden mit einem Kryostat (CM 050S Kryostat, Leica Microsystems; Wetzlar, Deutschland) $10\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt.

2.5.2.1. Immunhistochemische Färbungen

Der Großteil der histologischen Auswertung erfolgte nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode. Diese hat gegenüber anderen immunhistochemischen Verfahren den Vorteil, eine hohe Spezifität und Affinität für die Primärantikörper zu besitzen und somit unspezifische Bindungen und Hintergrundfärbungen zu minimieren. Dies war insbesondere für die quantitative Auswertung der Histologieschnitte von Bedeutung.

Nach dem Schneiden mussten die $10\ \mu\text{m}$ dicken Kryoschnitte mindestens 30 Minuten auftauen, bis sie Raumtemperatur (RT) erlangt hatten. Anschließend wurden sie 10 min

lang bei -20°C in Aceton (Sigma Aldrich Inc., Saint Louis, USA) fixiert, um danach für ca. 5 min auf einer Heizplatte (max. 42°C) zu trocknen. Anschließend erfolgte eine Umrandung der Schnitte mit einem PAP pen (Science Services GmbH, München, Deutschland) und die Platzierung in einer feuchten Kammer, in welcher alle folgenden Schritte abliefen. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers im Gewebe wurde nun 10% BSA/Tris-Lösung (Bovine Serum Albumin/Trishydroxymethyl-aminomethan) gegeben und für 30 min bei RT inkubiert, im Anschluss an das Blocken die überschüssige Lösung abgekippt und der Erstantikörper (siehe Tabelle 4) aufgetragen. Dafür wurden die entsprechenden Primärantikörper in 1% BSA/Tris und 2% Milchpulver verdünnt, in einer Dosierung von 50-100 μl auf die Schnitte pipettiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit den Schnitten in der feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag konnten die Schnitte 3 x je 10 min lang in Tris-Lösung gewaschen und anschließend zur Blockierung der endogenen Phosphatase für 20 min bei RT in eine Lösung, bestehend aus 200 ml Methanol + 3,5 ml 30% H_2O_2 , gegeben werden. Anschließend erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen in Tris.

In der Zwischenzeit war der spezifische Sekundärantikörper (z.B. goat anti-rabbit) vorbereitet worden. Dieser wurde zunächst 1:1 mit Rattenserum für 1 h bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit 1% BSA/Tris 1:100 verdünnt. (d.h. z. B. durch Vorinkubierung von 5 μl Sekundärantikörper zunächst mit 5 μl Rattenserum und anschließender Verdünnung mit 990 μl BSA/Tris). Von dieser Lösung wurden nun 50 - 100 μl auf jeden Schnitt aufgetragen und erneut für 30 min bei RT inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen in Tris-Lösung wurden pro Schnitt 50 - 100 μl des Streptavidin-Biotin-Komplexes (Vectastain ABC-Peroxidase-Kit, Linaris GmbH, Bettingen, Deutschland) aufgetragen und wiederum für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in Tris erfolgte die DAB-Färbereaktion, indem eine DAB-Tablette (DAB Tablets, 10 mg, pH 7.0, Kem-En-Tec, Kopenhagen, Dänemark) in 10 ml Aqua dest. aufgelöst und, nach Zugabe von 10 μl H_2O_2 kurz vor Gebrauch, durch einen Filter bei RT auf die Schnitte aufgetragen wurde. Nach 10-minütiger Inkubationszeit bei RT beendete zweimaliges Waschen in Aqua dest. die Reaktion.

Tabelle 4: In den Immunhistochemiefärbungen verwendete Antikörper (AK) mit Verdünnung, Ursprungsspezies (Host) und Sekundärantikörper (Sek.-AK)

Antikörper	Konzentration	Host	Sek.-AK	Konzentration Sek.-AK
Anti-Human IgG	1:200	rabbit	biotinylated anti-rabbit IgG	1:200
Aquaporin 4	1:500	rabbit	biotinylated anti-rabbit IgG	1:200
C9neo	1:5000	rabbit	biotinylated anti-rabbit IgG	1:200
C5b-9	1:100	mouse	biotinylated anti-mouse IgG	1:200
EAAT2	1:100	rabbit	biotinylated anti-rabbit IgG	1:200
ED1	1:500	mouse	biotinylated anti-mouse IgG	1:200
GFAP	1:5000	rabbit	biotinylated anti-rabbit IgG	1:200

Anti-HumanIgG, polyclonal: Dako Cytomation; Glostrup, Denmark

Aquaporin 4, polyclonal: Sigma-Aldrich, Inc.; Saint Louis, MO, USA

C9neo: B.P. Morgan, Cardiff, Wales, UK

C5b-9, monoclonal: Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, MI, USA

EAAT2, polyclonal: Cell Signaling Technology, Inc.; Danvers, MA, USA

ED1 monoclonal: Linaris Biologische Produkte GmbH; Wertheim, Deutschland

GFAP, polyclonal: Millipore Corporation; Temecula, CA, USA

biotinylated anti-rabbit IgG: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

biotinylated anti-mouse IgG: Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, USA

Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun nach Mayer. Dazu wurden die Schnitte für 30 Sekunden in die vorbereitete Lösung (1 g Hämatoxylin, 1000 ml Aqua dest., 0,2 g NaJO₃, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Citronensäure) getaucht und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gewässert.

Zuletzt wurden die Schnitte für 2 min in eine aufsteigende Alkoholreihe (70% - 100% Ethanol) und abschließend für 2 x 10 min in Xylol (Vitro-Clud®, R.Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) getaucht und mit Deckgläsern eingedeckt sowie mit Nagellack umrandet, um sie vor dem Austrocknen zu schützen.

2.5.2.2. Immunfluoreszenzfärbungen

Der Vorteil der Immunfluoreszenzfärbung gegenüber der Immunhistochemiefärbung mit Peroxidase besteht darin, dass an einem Schnitt Mehrfachfärbungen gegen verschiedene Antigene angefertigt werden können. Hierzu werden zwei Primärantikörper aus verschiedenen Tierspezies (z.B. Kaninchen und Maus) durch entsprechend gewählte verschiedene Sekundärantikörper (z.B. goat-anti-rabbit, goat-anti-mouse), welche mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt sind, sichtbar gemacht. Diese Methode ermöglicht die Beziehungen von verschiedenen Epitopen zu visualisieren.

Nach dem Schneiden wurden die Kryoschnitte mindestens 30 min aufgetaut, bis sie Raumtemperatur (RT) erlangten, und anschließend für 10 min bei -20°C in Aceton fixiert. Im Anschluss an eine Trocknungsphase von 5 min. bei max. 42°C auf einer Heizplatte erfolgte die Umrandung mit PAP-pen und die Platzierung in einer feuchten Kammer für alle weiteren Schritte. Zunächst wurde 10% BSA/PBS-Lösung auf die Schnitte gegeben und für 30 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen des Erstantikörpers im Gewebe abzublocken. Nach Abkippen der BSA-Lösung wurde pro Schnitt 50 - 100 µl des in 1% BSA/PBS verdünnten Primärantikörpers aufgetragen und bei 4°C über Nacht (ca. 18 h) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 10 min in PBS gewaschen, die mit Fluorochromen gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 5) aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Eindeckung mit Vectashield Mounting Media with DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) und eine Gegenfärbung mit DAPI zur

Darstellung der Zellkerne. Um ein Ausbleichen bei Lagerung zu vermeiden, wurden die Schnitte bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt.

Tabelle 5: In der Immunfluoreszenz angewendete Antikörper, Ursprungstier (Host), Verdünnung und verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Host	Konz	Sek.-AK	Konz. Sek.-AK	Farbe
GFAP	mouse	1:100	Cy TM 3	1:100	grün
Aquaporin4	rabbit	1:500	Alexa Fluor®-488	1:400	rot
EAAT2	rabbit	1:100	Alexa Fluor®-488	1:400	rot

GFAP, monoclonal: ICN Biomedicals, Inc.; Aurora, Ohio, USA

Aquaporin 4, polyclonal: Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, MO, USA

EAAT2, polyclonal: Cell Signaling Technology, Inc.; Danvers, MA, USA

CyTM3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG:

Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA

Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG:

Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA

2.5.2.3. Verfahrenskontrolle

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers an die Geweboberfläche wurde bei jedem Färbevorgang bei einem Schnitt der Primärantikörper durch 10%-BSA ersetzt. Keiner dieser Kontrollschnitte wies ein DAB- oder Fluoreszenzsignal auf, sodass unspezifische Reaktionen der Zweitantikörper mit den Gewebeschnitten ausgeschlossen werden können.

2.6. Quantitative Analyse

Für die quantitative Analyse der Schnitte wurden von jedem Tier immunhistochemische Rückenmarksschnitte auf lumbaler Ebene in etwa der Höhe angefertigt, in welcher das Ende des Katheters zu erwarten war (ca. 6,5 cm unterhalb des 1. Halswirbels). Die Aufnahme der Schnitte erfolgte in einer 10-fachen Vergrößerung mit einem Axiophot 2

Mikroskop (Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland), welches mit einer CCD-Kamera (Visitron Systems, Tuchheim, Deutschland) ausgerüstet war. Wie in Abb. 8 dargestellt, wurden jeweils 4 - 5 Bilder pro Färbung angefertigt, 2 Bilder des Vorderhorns (rechts/links) und des Hinterhorns (rechts/links) sowie im Falle einer definierten intraspinalen Anreicherung von humanem IgG (sog. „Läsionsareal“) eine zusätzliche Aufnahme jener Region. Die Bilder wurden per Spot Advanced Software

(Windows, Version 4.5) aufgenommen, in einem jpg.-Format gespeichert und später mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Image-Pro Plus (Version 4.5.0.29, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) ausgewertet.

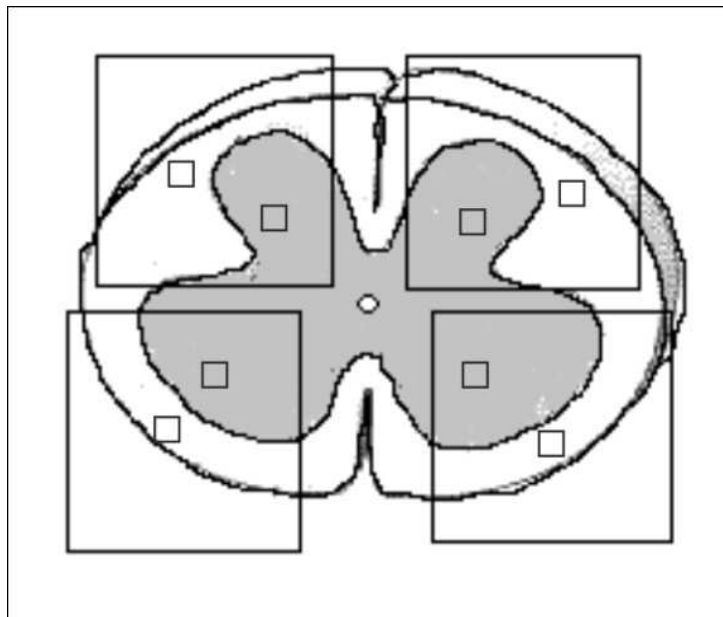


Abb. 8: Schematische Darstellung der histologischen Auswertung. Die großen Quadrate zeigen annähernd die in 10-facher Vergrößerung aufgenommenen jpg.-Bilder, die kleinen Quadrate demonstrieren die Lage der standardisierten AOI.

2.6.1. Aquaporin 4 und Anti-Human IgG

Bei den AQP4- und Anti-Human-IgG Färbungen wurde die Dichte des Farbsignals zur Auswertung herangezogen. Hierzu wurde eine standardisierte Area-of-Interest (AOI) von $62000 \mu\text{m}^2$ in jeder Aufnahme einmal in die graue und einmal in die weiße Substanz (randnah) gelegt, um die gesamte Dichte (density[mean]) innerhalb dieser AOI zu erheben. Zusätzlich erfolgten Aufnahmen der Läsionsareale. Aufgrund von Ausleuch-

tungs- und Aufnahme-problemen war dabei immer darauf zu achten, dass die Lage der AOI einen annähernd gleichen Abstand vom Bildrand hatte. Die Einzelwerte der verschiedenen Aufnahmen eines Schnittes wurden für weiße bzw. graue Substanz gemittelt und den Werten der Läsionen gegenübergestellt.

Aufgrund der großen Anzahl von Versuchen war es nicht möglich, alle Schnitte auf einmal zu färben und aufzunehmen. Dadurch kam es zu z. T. divergierenden Färbebildern, auch bei unbehandelten Schnitten. Infolgedessen musste eine Korrektur der Farbwerte durchgeführt werden. Dies geschah zunächst durch die Auswahl der beiden am stärksten und am schwächsten gefärbten Schnitte aus jeder Versuchsgruppe und die anschließende Division der Farbwerte mit den entsprechenden Schnitten aus einer Referenzgruppe. Aus den so gewonnenen Faktoren wurde ein Mittelwert für die weiße bzw. graue Substanz gebildet, mit welchem anschließend die Einzelwerte der Messungen multipliziert und somit korrigiert werden konnten. Da Image-Pro Plus die Werte auf der RGB-Skala basierend berechnet, somit ein hoher Farbwert einer schwachen Färbung entspricht, erfolgte eine Spiegelung der Farbwerte, um ein besseres intuitives Verständnis der Graphen zu erzielen, indem die Werte von 255 (maximaler Farbwert/weiß in der RGB-Skala) abgezogen wurden.

2.6.2. Anti-GFAP-Färbung

Bei den GFAP-Färbungen wurde ebenfalls eine Dichtemessung in der standardisierten AOI durchgeführt und korreliert. Zudem erfolgte eine Zählung und Größenmessung der immunreaktiven Astrozyten. Aufgrund der oben erwähnten Ausleuchtungsprobleme des Gesichtsfelds im Mikroskop erfolgte hierzu zunächst eine „Abschwächung“ der Hintergrundfärbung, um den Kontrast zwischen Farbsignal und Hintergrund zu verstärken. Anschließend wurden für jeden Schnitt manuelle Farbwerte festgelegt, innerhalb welcher sich die braun gefärbten Signale, nicht jedoch der unspezifische Hintergrund oder die blau gefärbten Zellkerne befanden. Nun wurde abermals die Anzahl der Signale, welche sich in der standardisierten AOI in der grauen bzw. weißen Substanz befanden, gezählt, dabei die Mindestgröße für eine in die Auswertung eingehende Struktur auf

mindestens 25 μm^2 festgelegt und der Anteil der angefärbten Fläche pro standardisierte AOI erhoben.

2.6.3. EAAT2

Die Auswertung der EAAT2-Färbungen erfolgte analog der Auswertung der Aquaporin-Färbungen. Nach Abzug einer Leeraufnahme zum Ausgleich der durch Aufnahme-probleme entstandenen Inhomogenität des Gesichtsfelds wurde analog zu Abb. 8 die standardisierte AOI in das Vorderhorn und Hinterhorn gelegt und eine Korrektur der Farbwerte vorgenommen. Die Mittelwerte der Aufnahmen der weißen und grauen Substanz wurden anschließend mit möglichen Läsionsarealen verglichen.

2.7. Statistische Auswertung

Der Vergleich der Messwerte der unterschiedlichen Gruppen untereinander erfolgte durch einen t-Test (Programm Sigma Plot 12.0, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Verfehlten einzelne Subgruppen in dem vorgeschalteten Normality Test nach Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) oder Equal-Variance-Test ($p > 0,05$) die vorgegebenen Grenzen für Normalverteilung, wurde ein Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt. Vergleiche mehrerer Gruppen erfolgten durch einen one-way ANOVA mit Bonferoni post-hoc Analyse bzw. im Fall wiederholter Messungen verschiedener Versuchsgruppen mit einem one-way repeated measures ANOVA mit Holm-Sidak pairwise multiple comparison Test. Unterschiede ab einem p-Wert von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Soweit nicht anders gekennzeichnet, erfolgt die Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler) in Diagrammen und Tabellen, Sterne in den Graphen geben Signifikanzniveaus an (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

3. ERGEBNISSE

3.1. Allgemeine Vorbetrachtungen

Bevor die Versuchsergebnisse der einzelnen experimentellen Gruppen dargestellt werden, werden hier zum besseren Verständnis gruppenübergreifende Beobachtungen und Definition ausgeführt.

3.1.1. Keine gruppenspezifischen Auffälligkeiten im Gewichtsverlauf

Die Tiere wurden zum Ausschluss schwerwiegender Beeinträchtigungen täglich gewogen. Nach einem vorübergehenden postoperativen Gewichtsverlust hatten alle Tiere zu Injektionsbeginn mindestens das Ausgangsgewicht wieder erreicht, die Mittelwerte der Gruppen lagen bei Versuchsbeginn zwischen 149,1 g +/- 3,3 g (NMO 1) und 224,4 g +/- 3,8 g (rAb^{AQP4} [0.5 mg/ml]), bei Versuchsende wogen die Tiere zwischen 159,2 g +/- 2,3 g (NMO 1) und 233,5 g +/- 3,7 g (rAb^{AQP4} [1 mg/ml]). In allen Gruppen war dabei

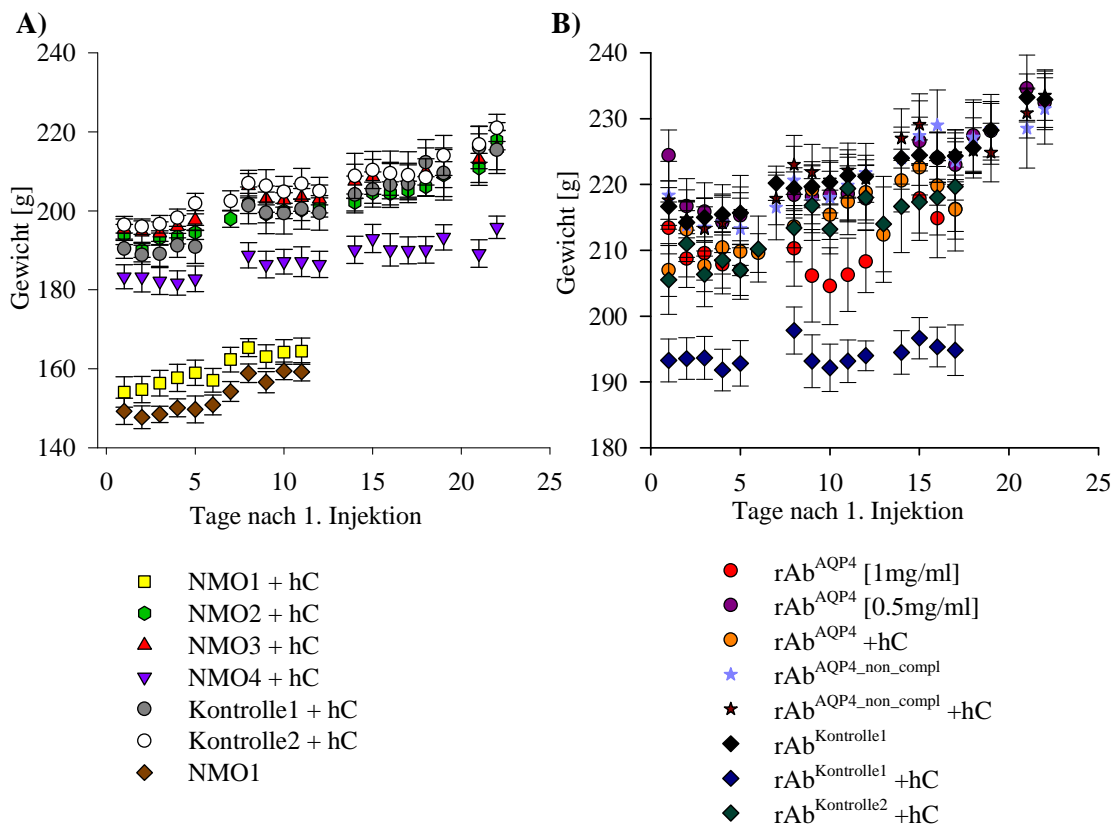


Abb. 9: Gewichtsverlauf der Versuchsgruppen seit der 1. Injektion; A) polyklonale Patienten-IgG, B) rekombinante Antikörper

eine Gewichtszunahme zwischen 0,8% (rAb^{Kontrolle1} + hC) und 15,8% (rAb^{AQP4} [1 mg/ml]) zu beobachten, eine Versuchsgruppen-spezifische stärkere oder schwächere Gewichtszunahme zeigte sich nicht.

3.1.2. MRT-Untersuchung ausgewählter Tiere

Zur Lagekontrolle der Katheter und zur Identifizierung der für die histologische Aufbereitung interessanten Regionen erfolgte bei ausgewählten Tieren nach Applikation des Kontrastmittels Gadofluorin eine spinale MRT-Bildgebung. Wie in Abb. 10A, C zu sehen ist, kommt es nach Applikation von rekombinanten, gegen AQP4 gerichteten Antikörpern zu langstreckigen KM-Aufnahmen im Bereich des thorakolumbalen Übergangs, welche sich in transversalen Aufnahmen (Abb. 10D - H) als zentromedullär in der grauen sowie in der weißen Substanz gelegen charakterisieren lassen (hier am Beispiel von anti-AQP4 spezifischen rAb gezeigt). Die Abb. 10D - F demonstrieren, dass die Kontrastmittelaufnahme am stärksten im Bereich der Katheterspitze ist: Kranial der Spitze (Abb. D) erkennt man das Lumen des Katheters mit zirkulär darum befindlicher KM-Aufnahme; auf Höhe der Katheterspitze (Abb. E) befindet sich der Ort des stärksten KM-Enhancements, während sich kaudal der Spitze (Abb. E) normal konfiguriertes Myelon zeigt.

Bei Applikation von Kontrollantikörpern (Abb. 10B, Beispiel rAb^{Kontrolle1}) kommt es nur zu geringgradiger Kontrastmittelanreicherung im Bereich der Katheterspitze. Es zeigt sich kein offensichtlich relevanter Unterschied bei Versuchstieren, die Antikörper gegen AQP4 mit oder ohne zusätzliche Komplementfaktoren bekommen haben. Es muss allerdings angemerkt werden, dass aufgrund der geringen Fallzahl untersuchter Tiere pro Versuchsgruppe keine formal vergleichenden Untersuchungen angestellt werden konnten.

3.1.3. Definition von Läsionsarealen in der histologischen Aufbereitung

Die Rückenmarksschnitte wurden entsprechend 2.5.2.1 mit einem Antikörper gegen humanes IgG gefärbt. Teilweise war eine außerhalb des Rückenmarks gelegene Bindegewebige Struktur (siehe Abb. 12A - D) zu erkennen, die der extraspinalen Bindegewebsreaktion um den Katheter nach längerer Liegezeit entspricht. In den meisten Versuchsgruppen mit Applikation von NMO-IgG oder AQP4-spezifischem rAb zeigte

sich eine von dieser Struktur zirkulär ausgehende, mit zunehmender Entfernung jedoch schwächer werdende Ablagerung von humanem Immunglobulin im Rückenmarksgewebe (Abb. 10B).

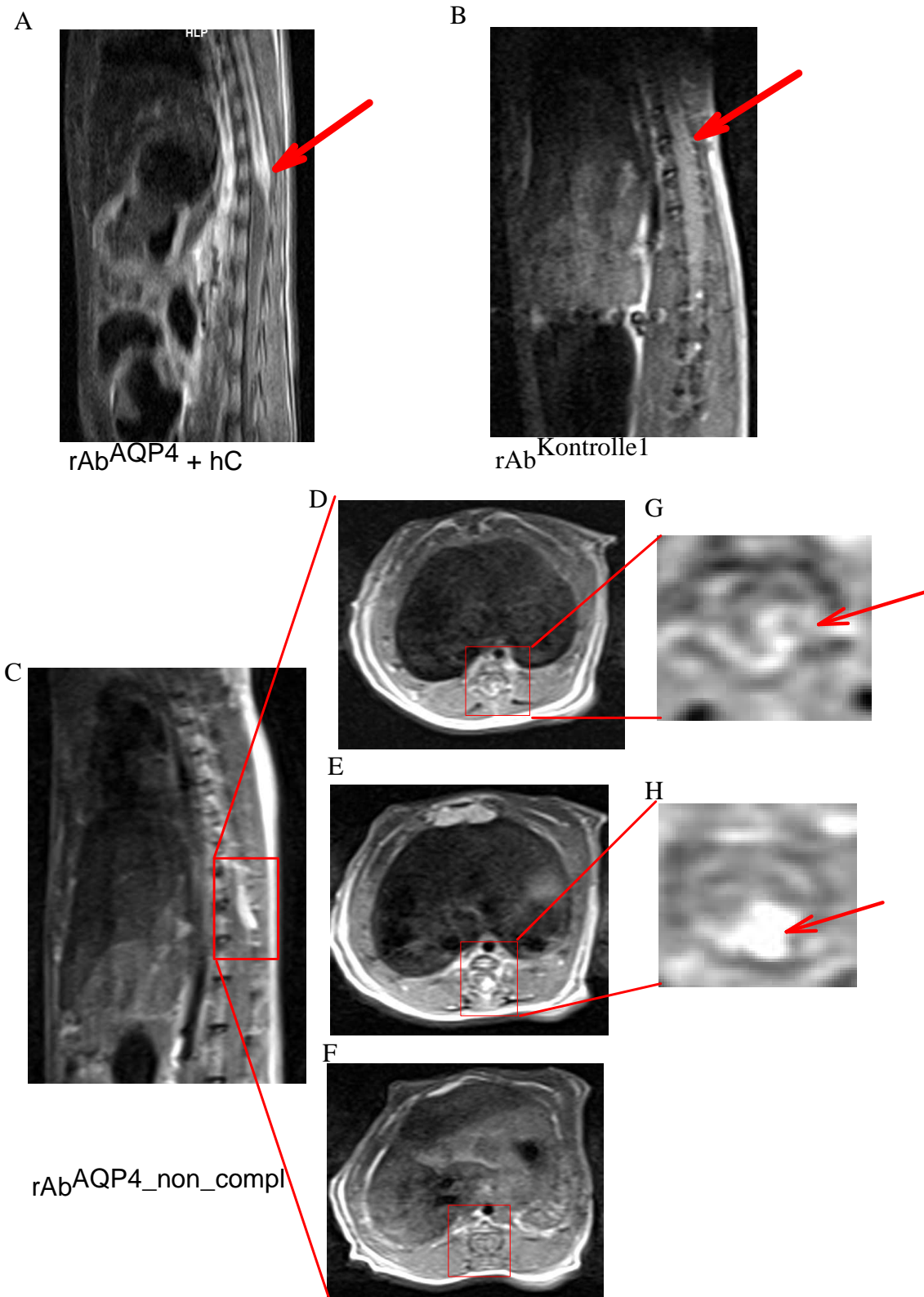


Abb. 10: Exemplarische MRT-Aufnahmen mit Gadoflourine: A) - C) sagittale Schnittführung, D) - F) transversale Schnitte aus C); G) + H) Vergrößerung aus D), bzw. E); Pfeile deuten auf das Katheterende, bzw. die KM-Anreicherungen im Myelon.

Folglich ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um das Katheterende handelt, den Ort, an welchem die höchste lokale Konzentration der applizierten IgG-Fractionen vorhanden ist. Diese Regionen werden deshalb als "läsionsverdächtige Areale" (LVA) bezeichnet und wurden wie oben beschrieben in den histologischen Auswertungen getrennt von der Gegenseite und den übrigen Schnitten untersucht. Selten war eine Seitendifferenz in Bezug auf die Anti-Human-IgG ohne Anwesenheit der beschriebenen Struktur vorhanden. Einschränkend muss zu dieser Methode der Auswertung festgestellt werden, dass die Anzahl der LVA zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen divergiert. Insbesondere in Versuchsreihen mit rekombinanten Antikörpern traten diese nur in seltenen Fällen auf. So waren in den Versuchsgruppen $rAb^{Kontrolle1} + hC$, $rAb^{AQP4} + hC$, $rAb^{AQP_non_compl}$, $rAb^{AQP_non_compl} + hC$ jeweils nur 1/7 der Schnitte, in den Gruppen $rAb^{Kontrolle}$ 1/10 und rAb^{AQP4} [1mg/ml] 2/7 betroffen (Abb. 11). Möglicherweise ist dies durch die jeweiligen Antikörper-Präparationen bedingt, eventuell auch durch die Gewebeentnahme, wenn z. B. der Katheter mitsamt der Umgebungsreaktion vom Myelon gelöst wurde. Die Anzahl an möglichen LVA konnte in der Auswertung nicht mehr durch weiter kranial oder kaudal geschnittene Gewebeproben dieser Tiere erhöht werden, was gegen ein Färbe- oder Präparationsartefakt in diesem Arbeitsschritt spricht.

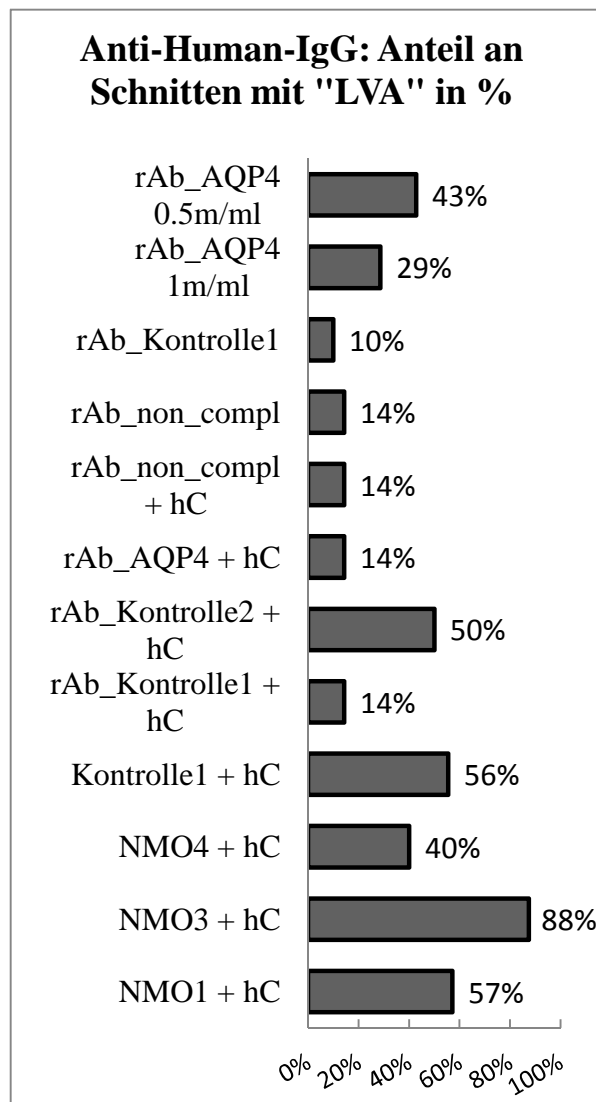


Abb. 11: Prozentuale Anzahl an LVA in der Anti-Human-IgG-Färbung

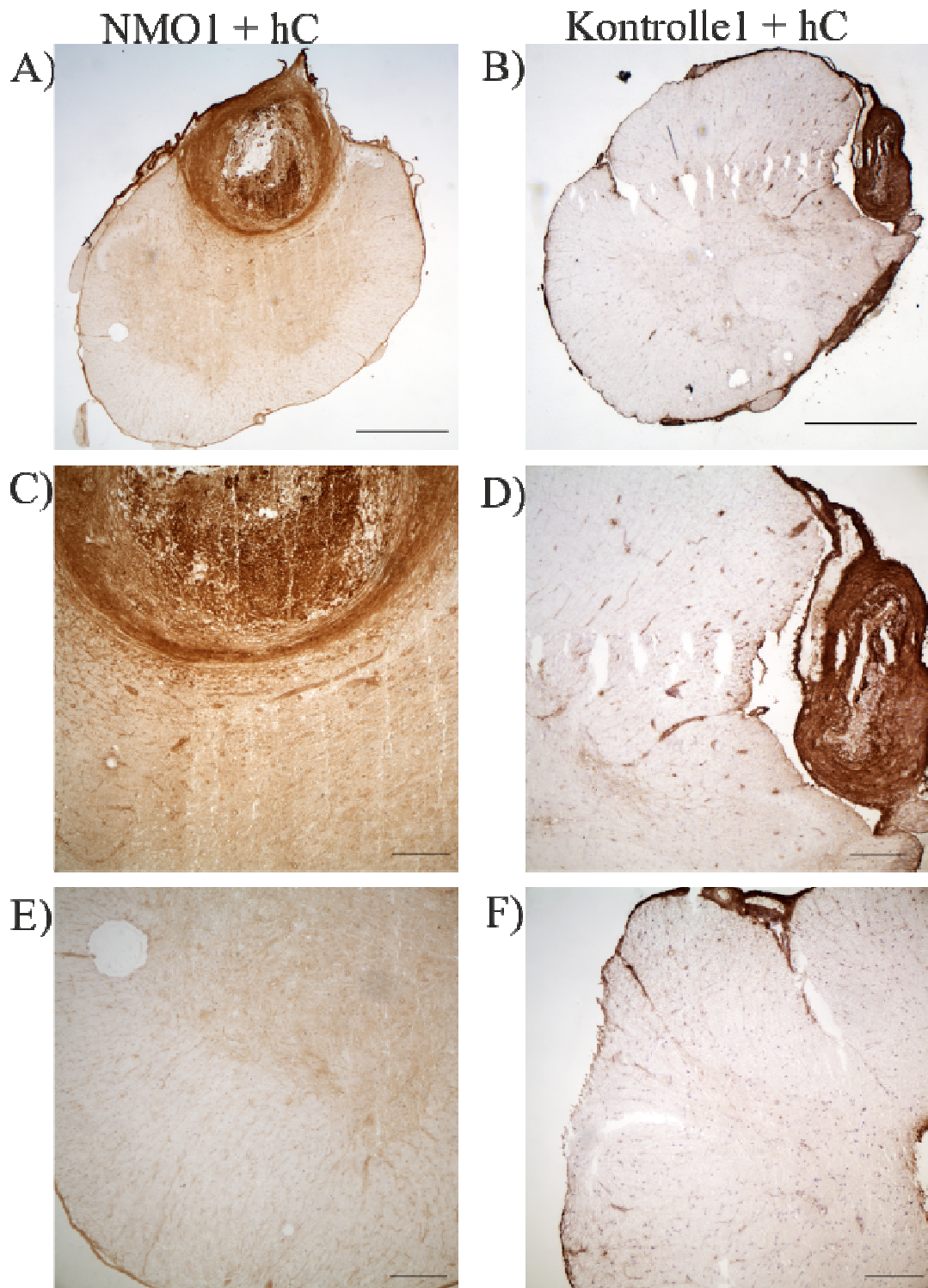


Abb. 12: Anti-Human-IgG-Färbung, A) + B) 2,5-fache Vergrößerung, Balken = 1000 µm;
 C) - F) 10-fache Vergrößerung. Balken = 200 µm C) + D) LVA (läsionsverdächtige Areale),
 E) + F) Gegenseite

3.2. Auswertung der Gruppen mit Patienten-IgG und zusätzlicher Gabe von aktivem humanem Komplement

3.2.1. Progressive klinische Verschlechterung durch Patienten-IgG + hC

In den Versuchsgruppen 2 - 5 kam es bei Applikation von aufgereinigtem Patienten-IgG zusammen mit humanem Komplement mit zunehmender Versuchsdauer zu einer fortschreitenden Verschlechterung des klinischen NMO-Scores (Abb. 13A). Hierbei zeigte NMO 4 + hC die langsamste, NMO 1 + hC die schnellste Progression der Symptome. Die Progression war nicht konsequent stetig, da es in den zweitägigen Pausen zwischen den Injektionsphasen z. T. zu einer gewissen Erholung, bzw. keiner weiteren Progredienz des Erscheinungsbildes kam.

Bei Versuchsende nach 3 Wochen mit insgesamt 15 Injektionen lag der jeweilige Score bei 4,5 +/- 0,2 (NMO 2 + hC), 4,8 +/- 0,5 (NMO 3 + hC) und 4,1 +/- 0,5 (NMO 4 + hC). Die Versuchsgruppe NMO 1 + hC wurde bei einem End-Score von 5,7 +/- 0,8 nach 2 Wochen (9 Injektionen) wegen starker Krankheitssymptome etlicher Tiere aus

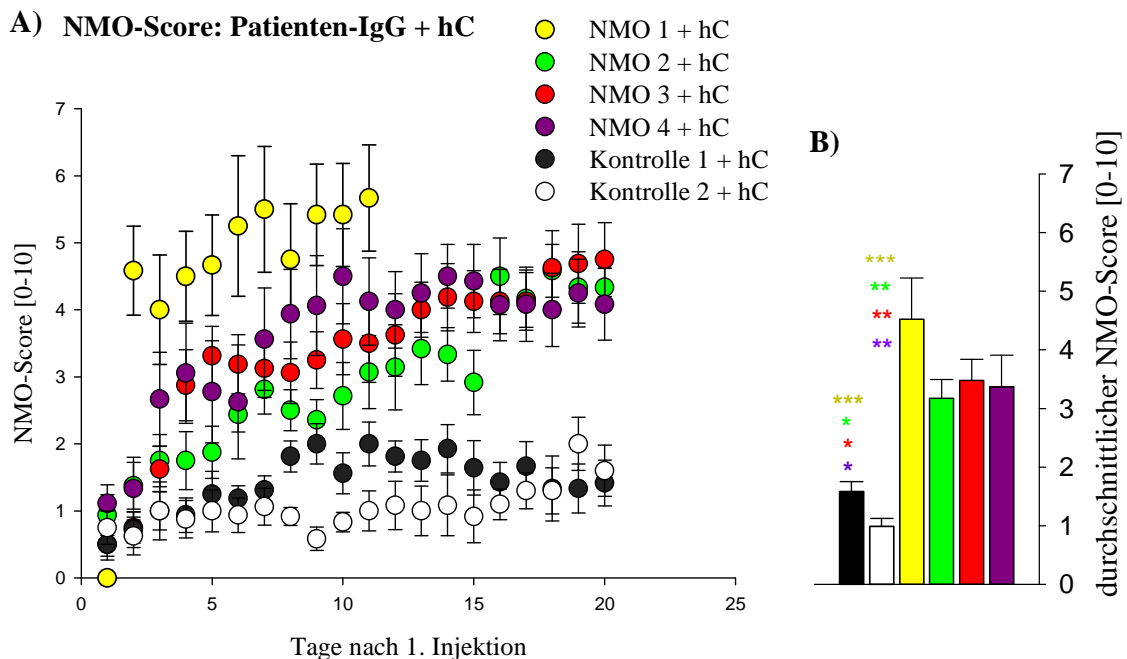


Abb. 13: Patienten-IgG + hC; A) Entwicklung des NMO-Scores in Tagen nach der 1. Injektion, B) statistischer Vergleich der gemittelten Durchschnittswerte der Scores; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollgruppen**

tierschutzrechtlichen Gründen vorzeitig beendet. In den beiden Gruppen, welche Kontroll-IgG mit humanem Komplement erhielten, kam es lediglich zu einem geringgradigen Anstieg des Scores auf 1,5 +/- 0,4 (Kontrolle 1 + hC), bzw. 2,0 +/- 0,4 (Kontrolle 2 + hC).

Im Vergleich der über die Zeit gemittelten Durchschnittswerte der Scores erzielten alle NMO-IgG-Gruppen mit 4,5 +/- 0,7 (NMO 1 + hC), 3,2 +/- 0,3 (NMO 2 + hC), 3,5 +/- 0,3 (NMO 3 + hC) und 3,4 +/- 0,5 (NMO 4 + hC) im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen mit 1,6 +/- 0,2 (Kontrolle 1 + hC), bzw. 0,98 +/- 0,13 (Kontrolle 2 + hC) stets signifikant höhere Erkrankungsscores (Details siehe Abb. 13B).

3.2.2. Verhaltenstestung

3.2.2.1. Abnahme der Laufleistung im Rotarod-Test

Sämtliche Versuchsgruppen wurden auf dem Rotarod unter forcierter Lokomotion getestet, dabei zeigten alle mit NMO 1 - 4 + hC behandelten Versuchsgruppen eine signifikante Abnahme der Laufzeiten in Relation zu den Ausgangstestungen (Abb. 14). So betrug die Laufleistung nach 15 Injektion 36,1% +/- 8,5% (NMO 2 + hC), 37,9% +/- 13,7% (NMO 3 + hC), 69,1% +/- 13,7% (NMO 4 + hC) der ursprünglichen Laufleistung. Gruppe NMO 1 + hC wurde vorzeitig beendet (Begründung s. 3.2.1), nach 9 Injektion lag die Laufleistung bei 43,7% +/- 7,8% des Ausgangswerts.

In den beiden Kontrollgruppen kam es zu keiner Zeit zu größeren Veränderungen der relativen Laufleistungen. Die Tiere liefen auch nach 15 Injektionen noch 98,4% +/- 25,5% (Kontrolle 1 + hC), bzw. 115,1% +/- 22,0% (Kontrolle 2 + hC) des Wertes der Baseline-Testung.

3.2.2.2. Keine Schwäche der Vorderläufe im Grip-Strength-Test

In allen Gruppen wurde über den Grip-Strength-Test die Haltekraft der Vorderpfoten gemessen (Abb. 15). Hierbei kam es weder in einer Versuchs- noch in einer Kontrollgruppe zu signifikanten Veränderungen.

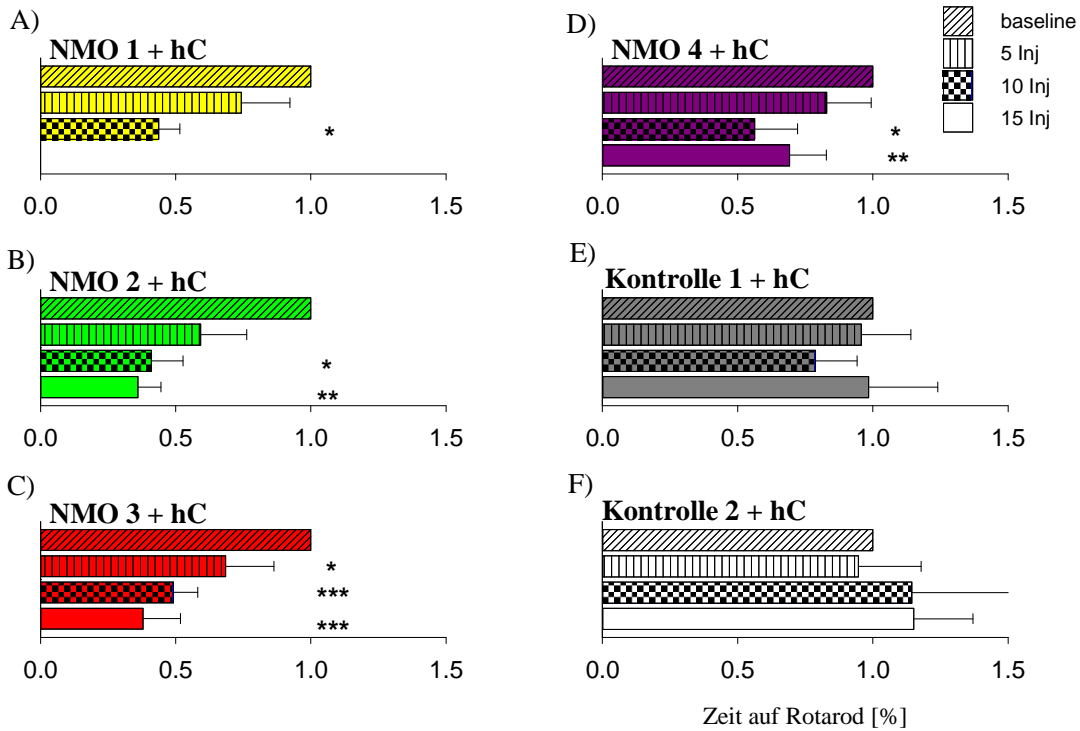


Abb. 14: Rotarod-Testung der Gruppen mit Patienten-IgG + hC, Werte in % relativ zur Baseline-Testung (entspricht 100%): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Baseline-Testung**

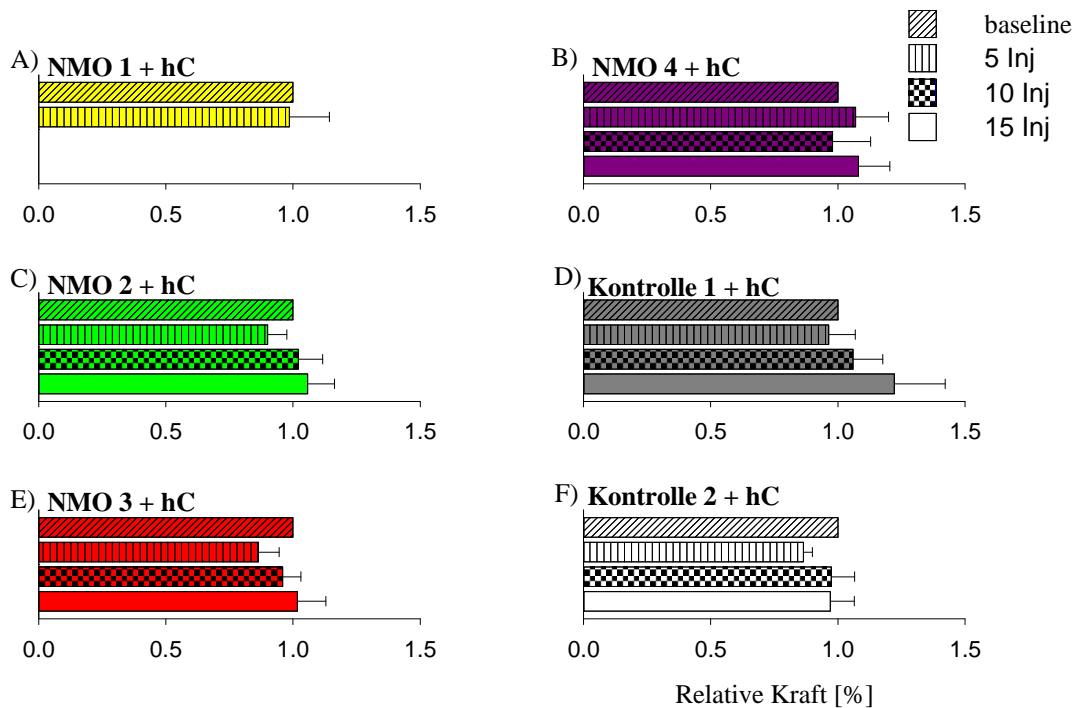


Abb. 15: Grip-Strength-Testung der Gruppen mit Patienten-IgG + hC, Werte in % relativ zur Baseline-Testung (entspricht 100%); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ im Vergleich zur Baseline-Testung**

3.2.3. Komplement-unabhängige Pathogenese auch bei Patienten-IgG

Wie bei den Analysen der Versuchsgruppen mit intrathekaler Applikation der rAbs (siehe 3.3.1) zeigte sich auch bei Verwendung der aufgereinigten Patientenantikörper durch additive Applikation von humanem Komplement keine signifikante Exazerbation der Symptome. So erreichte die Gruppe NMO 1 + hC einen Endwert von $5,7 \pm 0,8$, bzw. einen Durchschnittswert von $4,5 \pm 0,7$, während ohne zusätzliches Komplement (NMO 1) ein Endwert von $5,7 \pm 0,4$ und ein Durchschnitt von $3,8 \pm 0,4$ gemessen wurde (siehe Abb. 16).

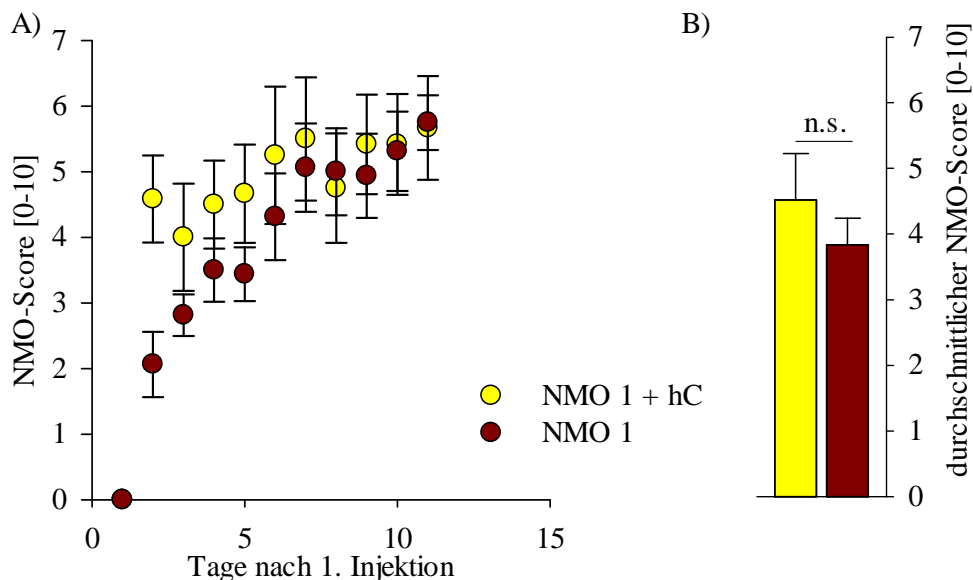


Abb. 16: NMO1 +/- hC; A) Klinischer Verlauf nach dem 1. Injektionstag, B) durchschnittlicher NMO-Score über den Beobachtungszeitraum nach Beginn der Injektionen

3.2.4. Histologische Aufarbeitung

3.2.4.1. Intraspinale Anreicherung von intrathekal appliziertem humanem IgG

In LVA nach Applikation von humanen IgG-Fractionen mit Antikörpern gegen AQP4 zusammen mit Komplement zeigte sich morphologisch eine intensive Färbung der weißen und grauen Substanz, welche mit zunehmender Distanz zum vermuteten Katheterende abnahm (Abb. 17).

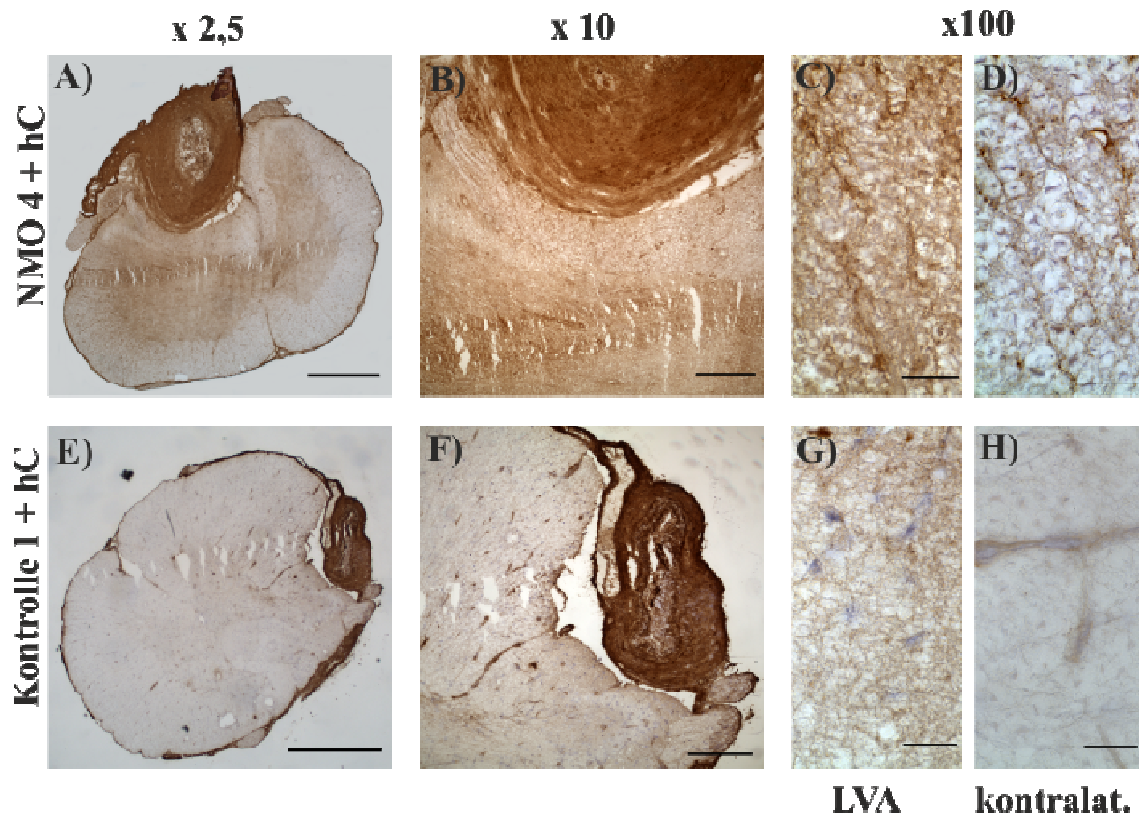


Abb. 17: Anti-Human-IgG Färbung; A) - D) Versuchsgruppe NMO4 + hC, A) Übersicht; B) Angeschnittenes Kapselende mit hiervon ausgehend deutlicher Infiltration des Gewebes; C) Vergrößerung in Nähe des Kapselendes mit deutlich gefärbtem dichtmaschigem Netz an Astrozyten sowie Gefäßen; D) Gegenseite mit schwächerer Färbung; E) - H) Kontrolle 1 + hC; E) Übersicht, F) Angeschnittenes Kapselende ohne weitergehende Farbinfiltrationen, G) kapselnahe Ausschnitt und D) Gegenseite zeigen kaum Reaktivität; Vergrößerungen: 2,5-fach (A, E, Balken: 1000 μ m), 10-fach (B, F, Balken: 250 μ m), 100-fach (C, D, G, H, Balken: 25 μ m)

In diesen Arealen ist die Farbintensität in der Dichtemessung in der quantitativen Auswertung signifikant größer als in der jeweils gegenüberliegenden weißen Substanz. Die Mittelwerte der weißen Substanz betragen 151,7 \pm 2,1 (NMO 1 + hC), 151,6 \pm 1,2 (NMO 3 + hC) und 149,0 \pm 1,8 (NMO 4 + hC), die Werte der LVA sind mit 162,1 \pm 3,4 (NMO 1 + hC), 166,7 \pm 4,0 (NMO 3 + hC) und 159,6 \pm 2,8 (NMO 4 + hC) statistisch signifikant höher (Abb. 18 A-C). Die Dichtewerte der grauen Substanz liegen mit 154,2 \pm 2,6 (NMO 1 + hC), 150,1 \pm 1,0 (NMO 3 + hC), 150,3 \pm 2,4 (NMO 4 + hC) und 153,3 \pm 1,8 (Kontrolle 1 + hC) im Bereich der Werte der weißen Substanz. Sie weisen ähnliche Dichteunterschiede zu den LVA auf.

In der Kontrollgruppe zeigen die dem Katheterlumen benachbarten Areale mit einer Dichte von 154,5 +/- 4,0 gegenüber 150,9 +/- 1,1 in der gegenüberliegenden weißen Substanz (Abb. 18 D) keine Unterschiede. Es ist anzumerken, dass das Gewebe aus der Versuchsgruppe NMO 2 + hC nicht untersucht werden konnte, da es durch einmaliges Auftauen vor der Verarbeitung histologisch nicht mehr verwertbar war.

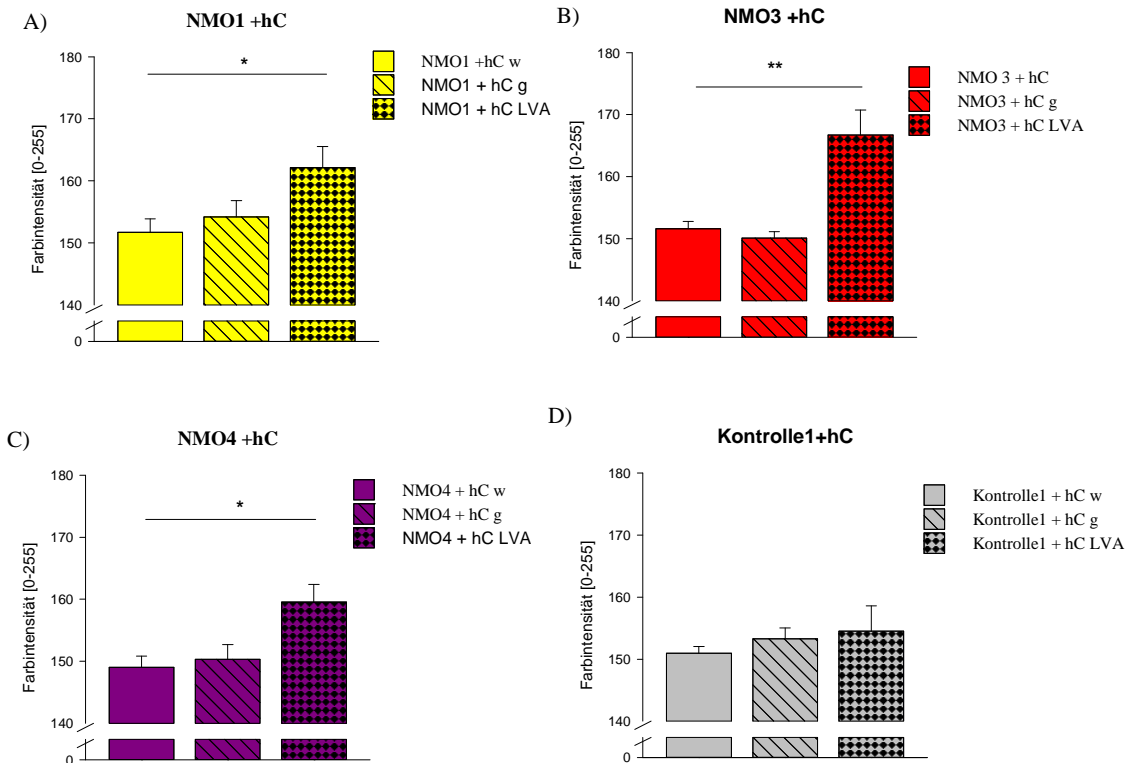


Abb. 18: Patienten-IgG: Quantitative Auswertung der Anti-Human-IgG-Färbung; *p<0,05; **p<0,01

3.2.4.2. Reduktion von Aquaporin 4

An den oben definierten LVA mit Anreicherung von Patienten-IgG mit hochtitrigen Antikörpern gegen AQP4 kommt es in der AQP4-Färbung zu einer Reduktion der immunreaktiven Strukturen. Während in der Kontrollgruppe (Kontrolle 1 + hC) sowohl in ipsi- als auch kontralateral zur Katheteröffnung ein dichtes, eng verzweigtes Netz an AQP4-positiven Fortsätzen zu beobachten ist, kommt es in den LVA der Gruppen mit NMO-IgG zu einer morphologischen Rarefizierung und teilweisen Depletion (Abb. 19).

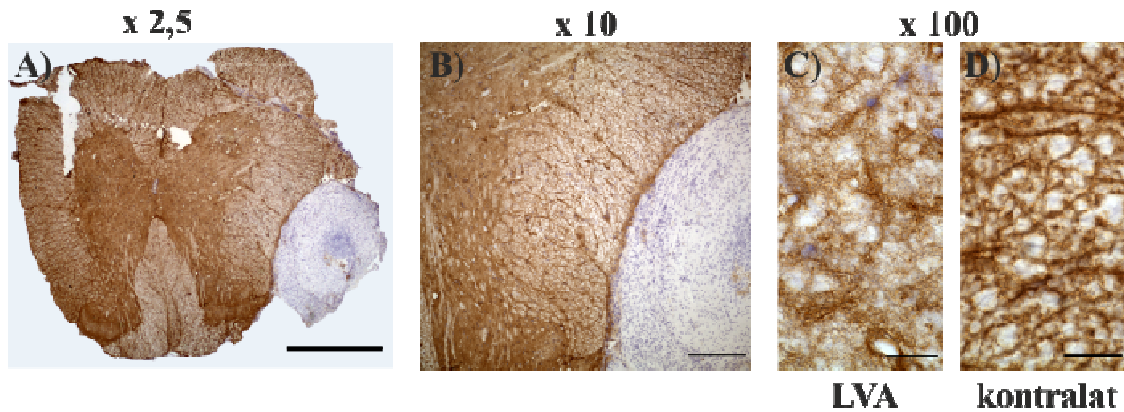


Abb. 19: AQP4-Färbung, Depletion der Immunreaktivität im Bereich der LVA, Skalierungsbal-
ken: A) 1000 μ m, B) 250 μ m, C,D) 25 μ m

In der quantitativen Auswertung weist aufgrund der Verteilung von AQP4 im Rückenmark erwartungsgemäß die graue gegenüber der weißen Substanz eine stets tendenziell höhere Dichte auf. Die Durchschnittswerte liegen bei 102,4 \pm 1,9 (NMO 1 + hC), 103,3 \pm 4,7 (NMO 3 + hC), 99,3 \pm 1,8 (NMO 4 + hC) und 103,6 \pm 4,4 (Kontrolle 1 + hC) in der weißen Substanz sowie bei 107,4 \pm 2,0 (NMO 1 + hC), 112,6 \pm 3,1 (NMO 3 + hC), 110,1 \pm 2,4 (NMO 4 + hC) und 123,0 \pm 6,8 (Kontrolle 1 + hC) in der grauen Substanz.

Die LVA zeigen gegenüber der weißen Substanz verminderte Dichtewerte von 91,0 \pm 4,2 (NMO 1 + hC), 85,9 \pm 5,9 (NMO 3 + hC) und 81,2 \pm 8,1 (NMO 4 + hC) (Abb. 20), sodass die augenscheinliche Depletion von AQP4 in den LVA auch statistisch belegt werden kann.

In der Kontrollgruppe besitzen die LVA zwar ebenfalls eine leicht reduzierte Durchschnittsdichte von 91.622 \pm 9.503 gegenüber der kontralateralen weißen Substanz, dies ist jedoch nicht signifikant ($p = 0.212$). Die statistische Aussagekraft insbesondere der Kontrollgruppe ist durch eine starke Divergenz der einzelnen Messwerte vermindert.

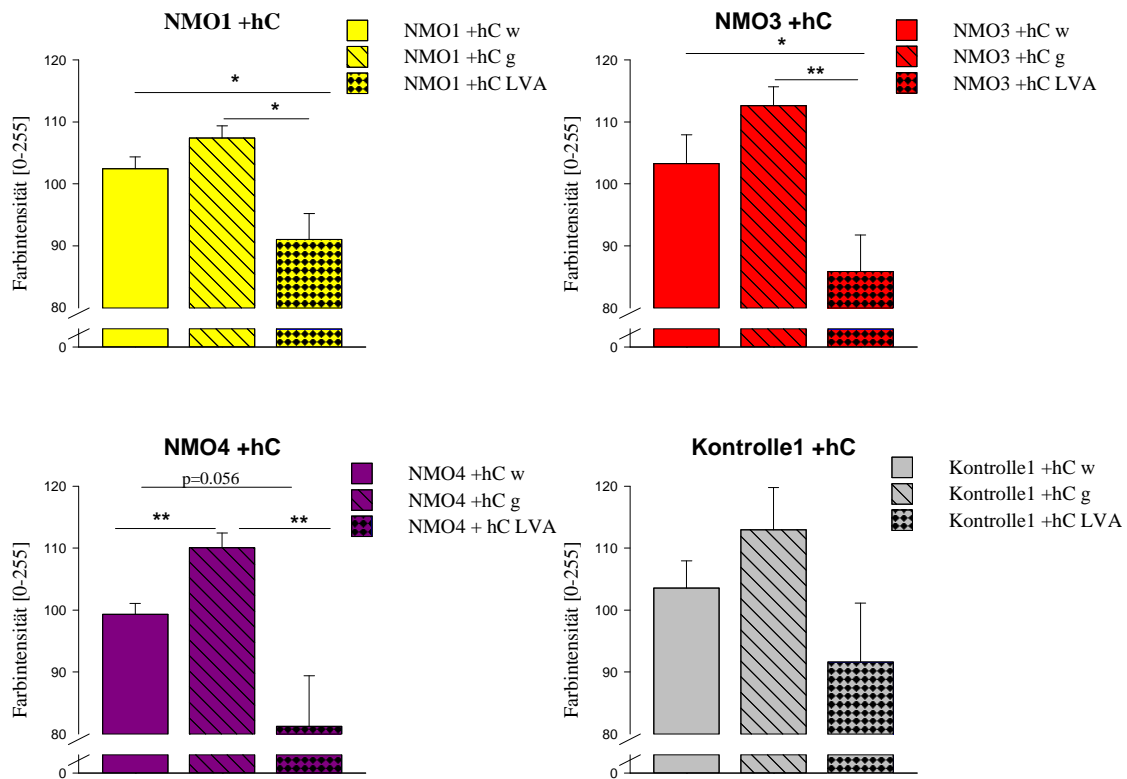


Abb. 20: Quantitative Auswertung der Anti-AQP4-Färbung in den Gruppen mit Patienten-IgG; *p<0,05; **p<0,01

3.2.4.3. EAAT2-Depletion in den läsionsverdächtigen Arealen

Aufgrund der postulierten Koexpressivität von EAAT2 und AQP4 und der somit möglichen Funktionsstörung dieses Glutamattransporters bei der Pathogenese der NMO erfolgten Analysen der Expression von EAAT2 im Rückenmark.

Bildmorphologisch zeigt sich im Bereich der läsions-verdächtigen Areale eine Depletion von EAAT2. Diese tritt aufgrund des lokalen Konzentrationsgefälles zumeist in der weißen Substanz auf und zeigt eine im Vergleich zur kontralateralen Seite reduzierte Immunreaktivität (Abb. 21 C, D). In Fällen mit großen Läsionsarealen ist auch in der allgemein viel stärker gefärbten grauen Substanz eine deutliche Verringerung der EAAT2-Dichte zu beobachten (exemplarisch in Abb. 21 A zu erkennen).

In der quantitativen Auswertung lässt sich dieser Eindruck objektivieren. So erreichen die läsionsverdächtigen Areale Farbwerte von 94,1 +/- 2,7 gegenüber kontralateralen 105,0 +/- 2,1 (NMO 1 + hC), 103,1 +/- 1,1 und 109,5 +/- 1,2 (NMO 3 + hC) sowie 116,3 +/- 0,8 gegenüber 120,4 +/- 0,6 (NMO 4 + hC) (siehe Abb. 22).

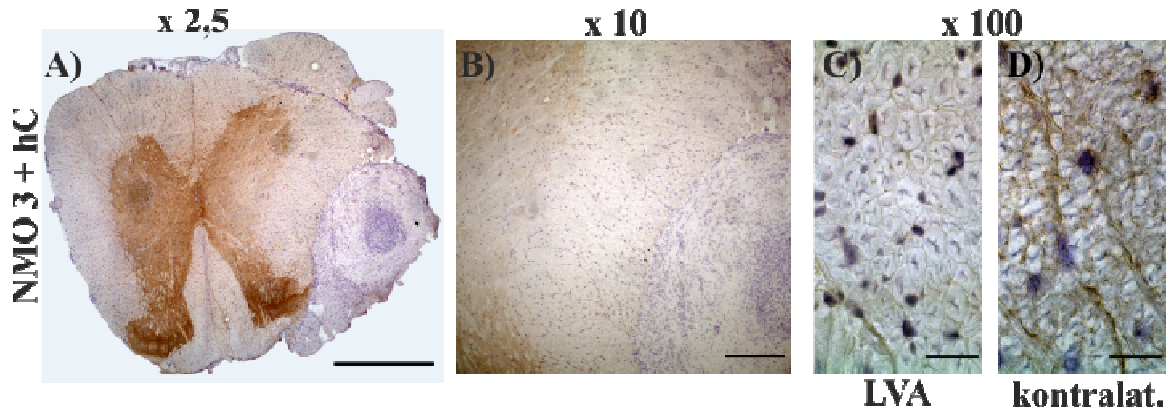


Abb. 21: Exemplarische EAAT2-Färbung (NMO 3 + hC), Skalierungsbalken: A) 1000 μ m; B) 250 μ m; C) + D) 25 μ m; A) Übersicht des Rückenmarksschnitts mit deutlichem Verlust der EAAT2-Reaktivität im Anschluss an das läsionsverdächtige Areal; B) Ausschnitt des LVA in 10-facher Vergrößerung; C) weiße Substanz des LVA im Vergleich zu D) kontralateraler Seite, in LVA deutlich reduzierte EAAT2-Färbung

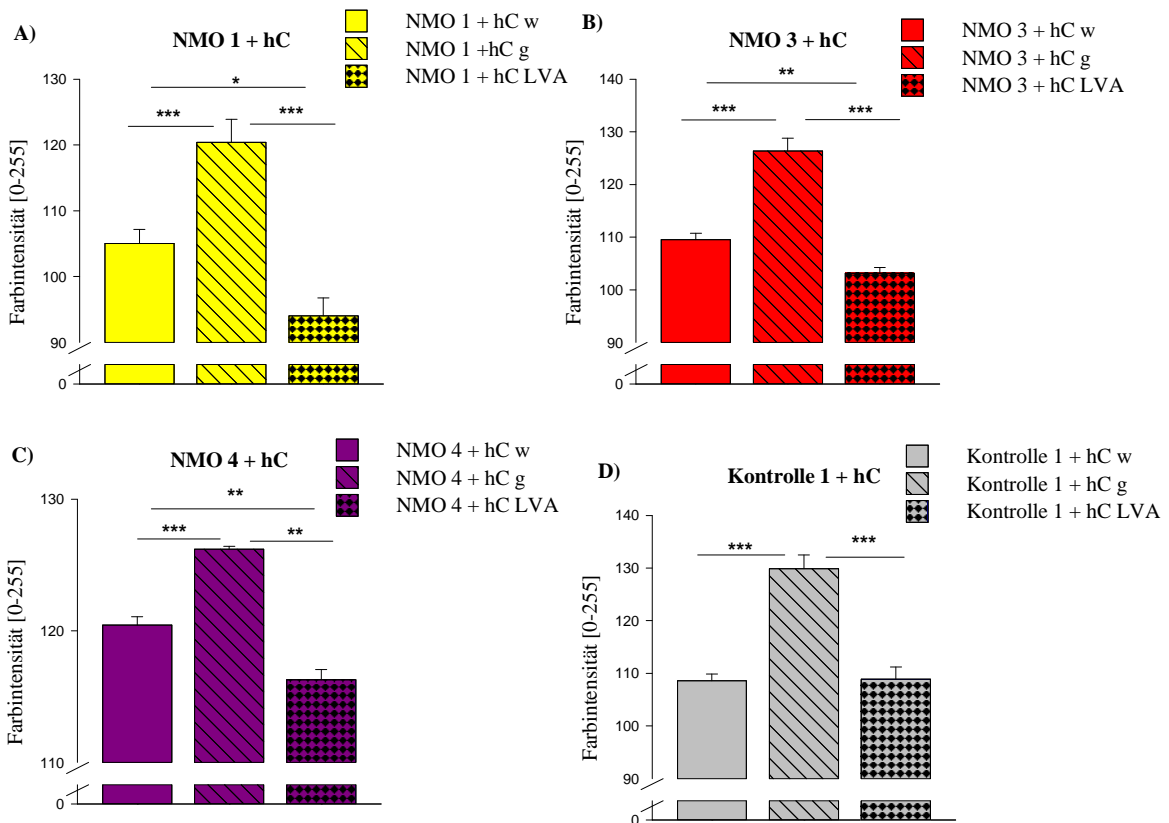


Abb. 22: Quantitative Auswertung der EAAT2-Färbung der Gruppen mit Patienten-IgG + hC; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In der Kontrollgruppe zeigen die LVA mit $108,9 \pm 2,3$ gegenüber $108,6 \pm 1,3$ in der kontralateralen weißen Substanz keine signifikanten Differenzen. Die Farbwerte in der grauen Substanz liegen konsequent deutlich über den Werten der weißen Substanz, im Einzelnen betragen die Mittelwerte $120,4 \pm 3,5$ (NMO1 + hC), $126,4 \pm 2,5$ (NMO 3 + hC), $131,8 \pm 1,4$ (NMO 4 + hC) und $129,9 \pm 2,6$ (Kontrolle 1 + hC).

Im Vergleich der Expression von EAAT2 (Abb. 21) und AQP4 (Abb. 19) im Bereich der LVA entsteht der Eindruck, dass das Areal der EAAT2-Depletion dasjenige der AQP4-Reduktion überschreitet.

3.2.4.4. Analyse der Astrozyten - verminderte Dichte von GFAP

In NMO-Tiermodellen wurde bei Einwirkung von NMO-IgG und aktiviertem Komplement zumeist eine mehr oder weniger vollständige Depletion von Astrozyten beschrieben.

Überraschenderweise ist in den Tieren mit intrathekaler Applikation von NMO-IgG keine Depletion, sondern eine deutliche Hypertrophie GFAP-positiver Astrozyten im Bereich der Katheterendigung zu beobachten. Diese geht z. T. deutlich über die LVA hinaus, sodass in den folgenden quantitativen Beobachtungen nicht nur die LVA mit der kontralateralen weißen Substanz verglichen wird, sondern auch die den LVA benachbart gelegene graue Substanz mit der gegenüberliegenden Seite.

Das morphologische Bild zeigt in den Läsionen hypertrophe Astrozyten mit aufgequollenen Somata (Abb. 23 E, G). Jedoch sind diese Gliazellen offenbar weniger verzweigt. Die Hintergrundfärbung, welche in der weißen Substanz größtenteils aus Querschnitten von zur Schnittebene senkrecht verlaufenden Fortsätzen besteht, erscheint in den Läsionen oft vermindert oder fragmentiert sodass möglicherweise eine reaktive Hypertrophie einzelner Astrozyten bei gleichzeitigem Untergang anderer Astrozyten vermutet werden kann.

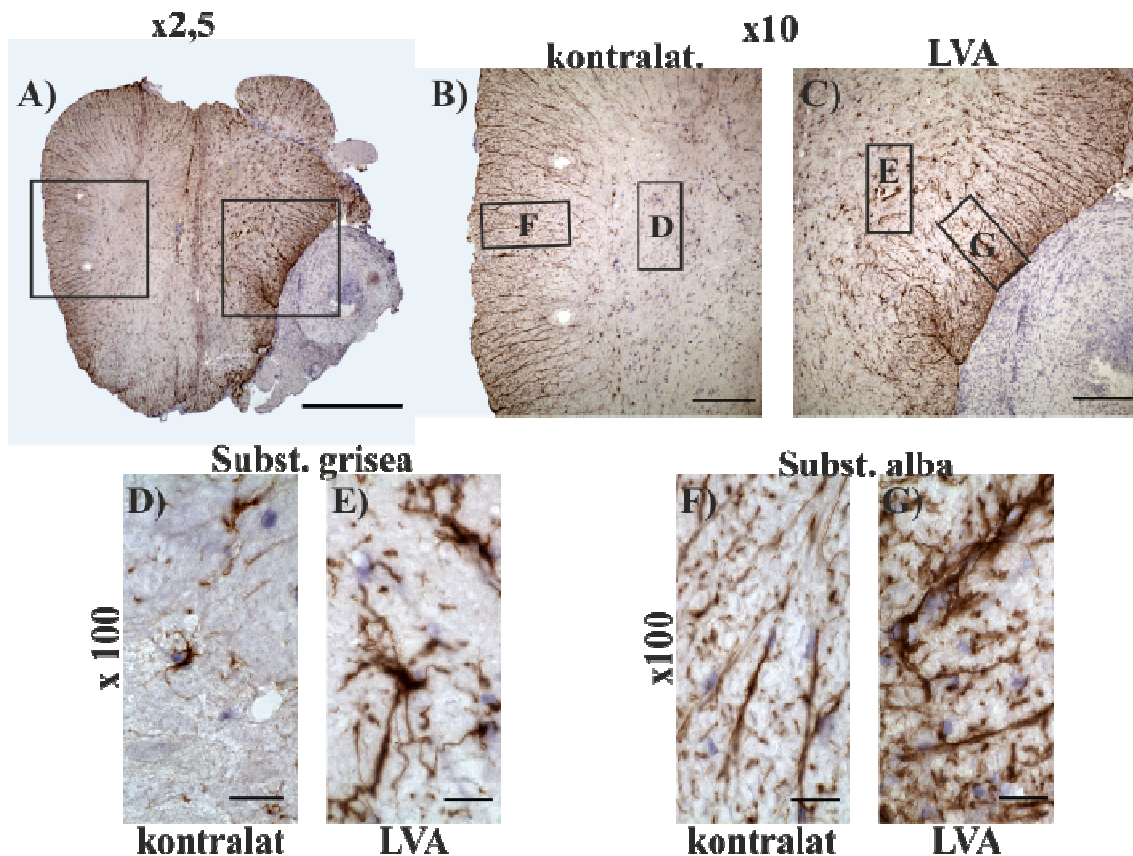


Abb. 23: Exemplarische GFAP-Färbung der Gruppe NMO 3 + hC; Skalierungsbalken: A) 1000 μ m; B) + C) 250 μ m; D) - G) 25 μ m; A) Übersicht des Rückenmarkschnitts mit deutlicher Seitendifferenz, Quadrate geben die Lage der Bilder B) + C) an; B) Ausschnitt aus der dem Katheterende gegenüberliegenden Seite mit normalem Färbepild; Rechtecke geben die Lage der Ausschnitte D) + F) an; C) Kathernaher Ausschnitt mit deutlich hypertrophen Astrozyten, Rechtecke geben die Lage der Bilder E) + G) an; D) kontralateral und E) ipsilateral des Katheterende gelegene Ausschnitte der grauen Substanz mit deutlich vergrößerten, hypertrophen Astrozyten mit geschwollenen Somata ipsilateral; F) kontralateral und G) LVA-naher Ausschnitt aus der weißen Substanz, ipsilateral zeigt sich eine deutliche Hypertrophie der Astrozytenfortsätze, eine verstärkte Färbereaktion perivaskulär sowie eine größere Hintergrund-Farbreaktion im Vergleich zur Gegenseite.

In der quantitativen Auswertung der Dichtemessung (Abb. 24) weist allgemein die graue Substanz mit 116,1 \pm 1,6 (NMO 1 + hC), 116,7 \pm 2,3 (NMO 3 + hC), 113,9 \pm 2,2 (NMO 4 + hC) und 116,2 \pm 1,9 (Kontrolle 1 + hC) niedrigere Werte als die korrespondierende weiße mit 128,0 \pm 0,9 (NMO 1 + hC), 127,5 \pm 2,9 (NMO 3 + hC), 128,3 \pm 1,8 (NMO 4 + hC) und 124,2 \pm 2,5 (Kontrolle 1 + hC) auf.

In den möglichen Läsionsarealen (LVA) ist gegenüber der weißen Substanz eine verringerte Dichte zu beobachten (NMO 1 + hC: 117,8 \pm 1,6), NMO 3 + hC: 121,8 \pm 4,1, \pm -NMO4 + hC: 118,0 \pm 4,9). Zwar findet sich in der Kontrollgruppe Kontrolle 1 +

hC (116,3 +/- 3,1) ebenfalls eine Reduktion der Dichte, was allerdings nicht signifikant ist ($p = 0,083$).

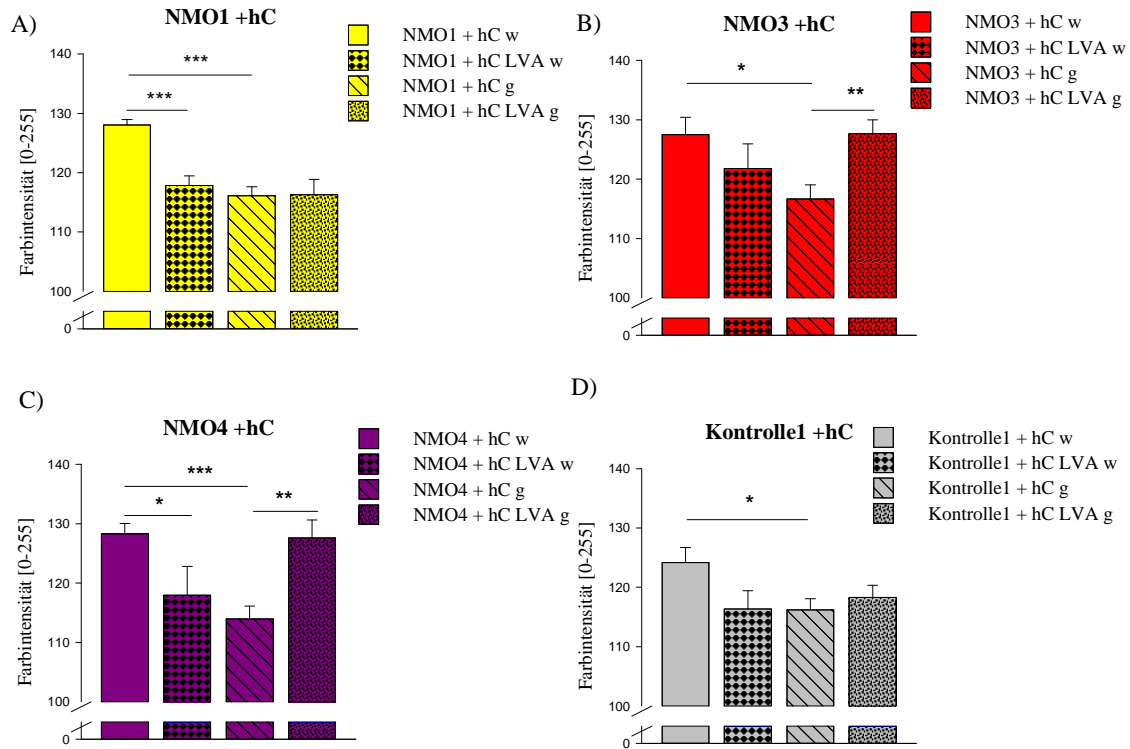


Abb. 24: Quantitative Auswertung der GFAP-Färbung [Density(mean)] der Patienten-IgG; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$**

Da sich Verlauf und Konfiguration von Astrozyten in der weißen und grauen Substanz unterscheiden und auch Veränderungen in der grauen Substanz zu beobachten sind, erfolgte eine Analyse der LVA-proximalen grauen Substanz gegen die kontralaterale Hemisphäre. In den Gruppen NMO 3 + hC (127,6 +/- 2,4) und NMO 4 + hC (127,6 +/- 3,0) zeigen sich signifikant erhöhte Dichtewerte, während diese in den Gruppen NMO 1 + hC (116,3 +/- 2,6) und Kontrolle 1 + hC (118,3 +/- 2,0) nicht zu beobachten sind. Dies spricht für eine reaktive Hypertrophie der Strukturen, welche nicht direkt in den LVA liegen, sondern an diese angrenzen.

3.2.4.5. Auswertung der GFAP-Expression - Anzahl an Astrozyten

Zusätzlich zur Dichtebestimmung wurden auch die als Astrozyten definierten Strukturen pro AOI gezählt (Abb. 25). Die Durchschnittswerte betragen 58,9 +/- 2,0 (NMO 1 + hC), 74,3 +/- 1,4 (NMO 3 + hC), 72,0 +/- 4,5 (NMO 4 + hC) und 79,6 +/- 3,6 (Kontrolle 1 + hC) in der weißen Substanz, bzw. 34,0 +/- 6,0 (NMO 1 + hC), 30,3 +/- 1,7 (NMO 3 + hC), 33,3 +/- 3,8 (NMO 4 + hC) und 27,6 +/- 2,2 (Kontrolle 1 + hC) in der grauen Substanz. Die LVA aller Patientengruppen weisen im Vergleich zur kontralateralen weißen Substanz jeweils eine tendenziell höhere Astrozytenzahl [71,0 +/- 15,0 (NMO 1 + hC), 84,7 +/- 8,7 (NMO 3 + hC) und 81,2 +/- 8,5 (NMO 4 + hC)] auf, während in der Kontrollgruppe mit 60,2 +/- 6,2 (Kontrolle 1 + hC) signifikant weniger Astrozyten gezählt werden. In der grauen Substanz zeigt lediglich NMO 3 + hC mit 45,5 +/- 4,8 signifikant mehr GFAP-positive Astrozyten. In den übrigen Gruppen liegen die Werte im Bereich der kontralateralen grauen Substanz. (42,7 +/- 18,0 für NMO 1 + hC. 29,8 +/-

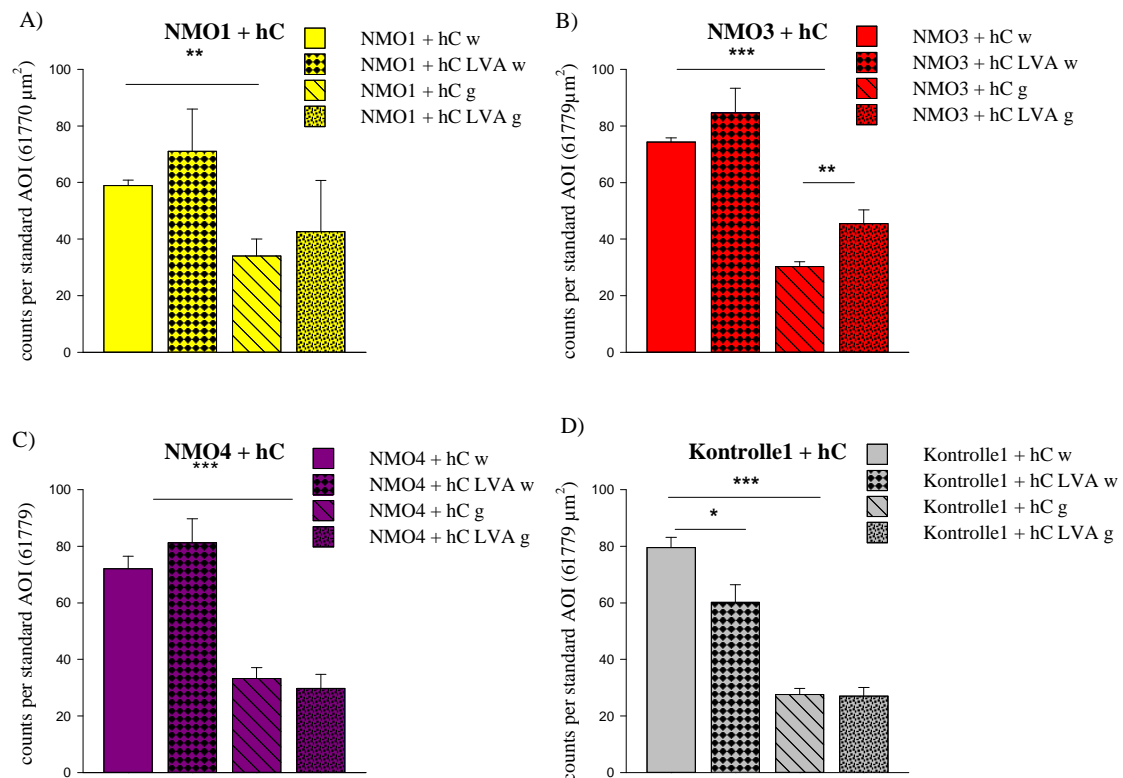


Abb. 25: Applikation von Patienten-IgG, Anzahl an GFAP-reaktiven Astrozyten pro Standard-AOI; es sind nur die im Sinne der Fragestellung relevanten statistisch signifikanten Unterschiede markiert, *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001**

4,9 für NMO 4 + hC und 27,0 +/- 3,1 für Kontrolle 1 + hC).

Da in diese Zählung nur Strukturen mit einer Mindestgröße von $25 \mu\text{m}^2$ eingegangen sind, werden hier hauptsächlich größere Astrozyten erfasst. Folglich kann das Ergebnis als Hinweis für eine Hypertrophie gewisser GFAP-positiver Astrozyten oder auf eine generelle Vermehrung der Astrozyten in den möglichen Läsionsarealen gewertet werden. Einige Schnitte weisen eine derart starke lokale Hypertrophie auf, dass davon auszugehen ist, dass mehrere Astrozyten in der Auswertung miteinander zu größeren Strukturen verschmolzen sind und somit nur als eine Struktur gezählt werden konnten. Somit dürfte die tatsächliche Zahl in den LVA noch etwas höher liegen als in den vorliegenden Graphen abgebildet.

3.2.4.6. Qualitative Auswertung der Komplementfärbungen

Um das Ausmaß der Aktivierung des applizierten Komplements zu beurteilen, wurden die Rückenmarksschnitte gegen den finalen membranangreifenden Komplex gefärbt.

In der C9-neo-Färbung, welche den aktiven lytischen Komplex nachweist, kann teilweise eine leichtgradige, vom Katheterende ausgehende diffuse Färbung der Rückenmarks beobachtet werden (Abb. 26A). Stellenweise scheint die Immunreaktivität perivaskulär betont zu sein. Insgesamt zeigt sich entgegen den Erwartungen und Vorbefunden aus Autopsiestudien und anderen Tiermodellen keine typische und ausgedehnte Aktivierung von Komplement im Gewebe. Hieraus kann geschlossen werden, dass das verwendete

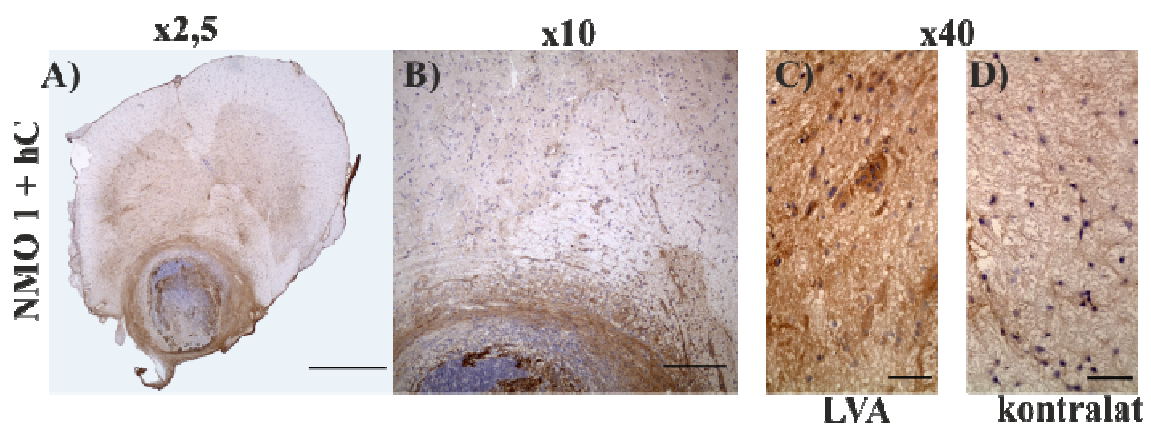


Abb. 26: Komplementfärbung C9neo am Beispiel von NMO1 + hC; Skalierungsbalken A) 1000 μm , B) 250 μm , C), D) 50 μm ; A) Übersicht des Rückenmarksschnitts mit geringgradiger Infiltration des Gewebes ausgehend vom Katheterende, B) Ausschnitt aus A) mit Anschnitt des Katheterendes, C) Katheter-nahe Region zeigt im Vergleich zu D) der kontralateralen Seite eine stärkere Farbreaktion mit perivaskulärer Anlagerung [zentral in C)].

Komplement nicht aktivierbar ist, dass die injizierten Antikörper nach Bindung an das Epitop kein Komplement aktivieren können oder dass in diesem Tiermodell die ko-injizierten Komplementfaktoren nicht ausreichend in aktiver Form an den Ort der Antikörperbindung gelangen können.

3.2.4.7. Geringe lokale Infiltration von ED1-postiven Makrophagen

In den Gruppen mit Ko-Injektion von NMO-IgG und humanem Komplement zeigt sich von den Katheterenden ausgehend eine Infiltration des extraspinalen Gewebes mit ED1-positiven aktivierten Makrophagen und viel geringer ausgeprägt in manchen Fällen auch intramedullär (Abb. 27). Diese Strukturen treten besonders in den LVA auf, sind jedoch in seltenen Fällen auch in entfernteren Arealen der Rückenmarksschnitte zu beobachten, allerdings bei weitem nicht in dem Ausmaß, wie es nach den publizierten Autopsiefällen mit Komplement-induzierter Gewebsschädigung zu erwarten gewesen wäre.

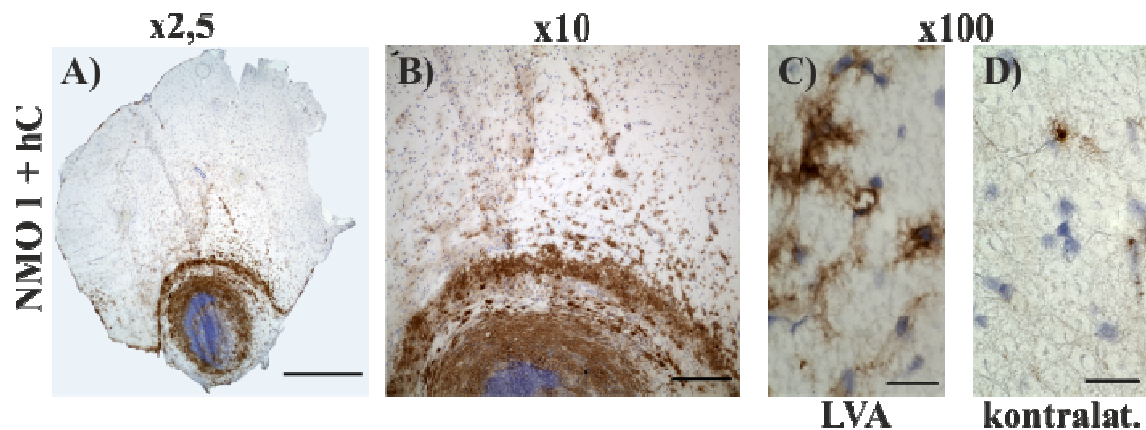


Abb. 27: ED1-Färbung am Beispiel NMO1 + hC; Skalierungsbalken: A) 1000 μm , B) 250 μm , C) + D) 25 μm ; A) Übersicht des Rückenmarksschnitts mit Färbung v.a. nahe des Katheterendes, B) Ausschnitt mit Teil des Katheterendes, C) Katheternaher Ausschnitt der weißen Substanz in 100-facher Vergrößerung, D) kontralaterale Seite, v. a. in den LVA zeigen sich etliche aufgetriebene, sternförmige Strukturen, die in deutlich kleinerem Ausmaß auch auf der Gegenüberliegenden Seite [zentral in D)] zu sehen sind.

3.3. Auswertung der Gruppen mit rekombinanten Antikörpern

3.3.1. NMO-Score

3.3.1.1. Progrediente Erkrankungszeichen durch rAb^{AQP4}

Wurde der rekombinante Antikörper rAb^{AQP4} ohne humanes Komplement appliziert, so verschlechterte sich der klinische Zustand der Versuchstiere progredient im Versuchsverlauf. Nach 13 Injektionen lag der End-Score bei 4,3 +/- 0,8, während der Kontrollantikörper rAb^{Kontrolle1} nur unspezifische Reaktionen bei einem End-Score von 0,1 +/- 0,3 verursachte (Abb. 28). Der durchschnittliche NMO-Score betrug 3,3 +/- 0,4 und war statistisch signifikant größer als der Durchschnittswert der Kontrollgruppe mit 0,8 +/- 0,3 (rAb^{Kontrolle1}) (Abb. 28 B).

3.3.1.2. Konzentrationsabhängigkeit der durch rAb^{AQP4} induzierten Symptome

Hierbei korrelierte die Stärke der Betroffenheit der Tiere mit der Konzentration der applizierten Antikörper. So lag bei der auf 50% reduzierten Konzentration von rAb^{AQP4} [0,5mg/ml] der End-Score bei 2,4 +/- 0,7. Dieser End-Score ist signifikant geringer als die Erkrankungssymptomatik in der Gruppe mit der Antikörperkonzentration von 1mg/ml. Der tatsächliche Unterschied ist noch etwas größer als er durch die Zahlenwerte zum Ausdruck kommt, da in der Gruppe rAb^{AQP4} [1mg/ml] der Versuch aufgrund der Beschwerdesymptomatik nach 13 Injektion beendet werden musste, während in der Vergleichsgruppe mit der niedrigeren Konzentration die üblichen 15 Injektionen erfolgten. In der absolut den Krankheitsverlauf eher unterschätzenden, aber statistisch robusteren Auswertung des Mittelwerts ist mit 1,9 +/- 0,4 ein signifikanter Unterschied gegenüber der höheren Konzentration festzustellen (Abb. 28 C).

3.3.1.3. Erkrankungszeichen nicht direkt Komplement-abhängig

In der vergleichenden Auswertung zeigt sich, dass sich in diesem Modell keine klare Komplementbeteiligung nachweisen lässt. Zwar liegen in der Gruppe mit zusätzlicher Injektion von aktivem humanen Komplement (rAb^{AQP4} + hC) sowohl der End-Score (5,9 +/- 0,4) als auch der Durchschnittscore (4,1 +/- 0,4) nominell über den Werten der Gruppe rAb^{AQP4} ohne Komplement (4,2 +/- 0,8, bzw. 3,3 +/- 0,4), dies ist jedoch nicht als statistisch signifikant anzusehen (Abb. 28 A, B).

Zur weiteren Abklärung der Rolle von Komplement stand darüber hinaus derselbe rekombinante Antikörper mit einer Punktmutation im F_c-Teil zur Verfügung, welche die Komplement-Aktivierung verhindert. Auch in dieser Versuchsgruppe (rAb^{AQP4_non_compl}) entwickelten die Tiere eine klinische Symptomatik. Die Stärke der Ausprägung war signifikant größer als in der Kontrollgruppe rAb^{Kontrolle1}, vergleichbar mit den Tieren der Gruppe rAb^{AQP4} [0,5 mg/ml] (Abb. 28 C), so wurden ein End-Score von 2,9 +/- 0,4 und ein Durchschnittswert von 1,9 +/- 0,1 gemessen. Insgesamt ist die Ausprägung allerdings niedriger als bei jenen Tieren, die die äquivalente Dosis an nicht mutiertem Antikörper rAb^{AQP4} erhalten hatten (Abb. 28 C).

In einer weiteren Kontrollgruppe wurde der mutierte Antikörper zusammen mit zusätzlich appliziertem humanem Komplement untersucht (rAb^{AQP4_non_compl} + hC). Hier lagen der finale Score bei 2,4 +/- 0,6 und der Durchschnitt bei 2,0 +/- 0,4 in der gleichen Größenordnung wie ohne zusätzliche Injektion von Komplement, woraus geschlossen werden kann, dass durch die Mutation tatsächlich keine hier messbare Komplement-Aktivierung erfolgt und dass Komplement-unabhängige Krankheitsmechanismen vorliegen (Abb. 28 C).

Der Kontrollantikörper zusammen mit humanem Komplement (rAb^{Kontrolle1} + hC) lag mit einem finalen Score von 0,7 +/- 0,5 und einem Durchschnittswert von 0,7 +/- 0,2 im Bereich der Gruppe ohne Komplement und signifikant unter den Gruppen mit AQP4-reaktiven Antikörpern (Abb. 28 A, B).

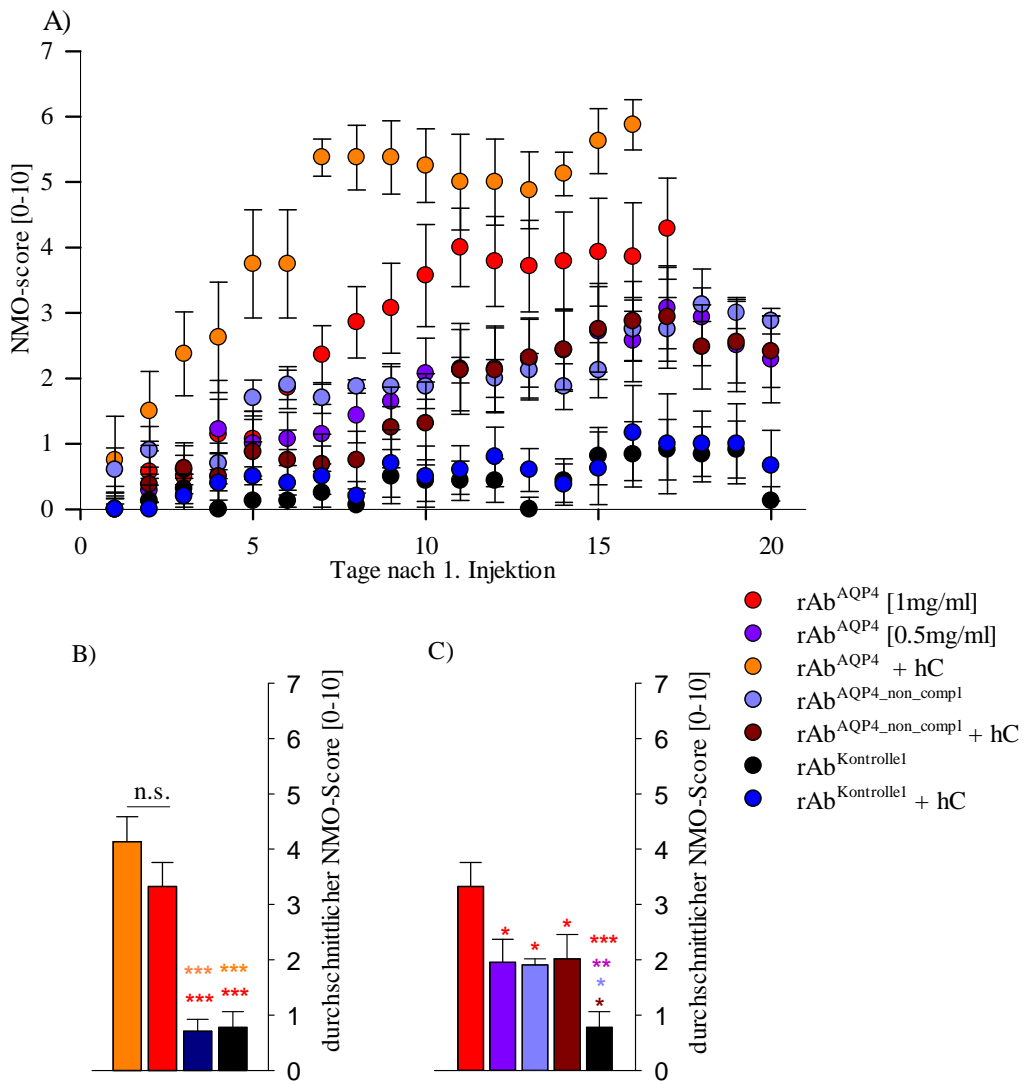


Abb. 28: NMO-Score nach Injektion der rekombinanten Antikörper: A) Klinischer Verlauf nach der 1. Injektion; B), C) statistische Auswertung der Mittelwerte über den gesamten Injektionszeitraum; B) signifikant vermehrte Symptome nach Injektion von rAb^{AQP4} und rAb^{AQP4} + hC gegenüber rAb^{Kontrolle1} und rAb^{Kontrolle1} + hC, keine signifikanten Unterschiede zwischen Gruppen mit und ohne hC; C) Applikation von rAb^{AQP4} [1 mg/ml] bewirkt signifikant mehr Symptome als auf 50% reduzierte Konzentration des IgG. AQP4-spezifische Antikörper mit mutiertem Fc-Teil haben unabhängig von zusätzlicher Komplementgabe signifikant größere Effekte im Vergleich zu Kontrollen, zeigen allerdings verminderte Effekte im Vergleich zu unveränderten rAbs gegen AQP4; Sterne geben farbkodiert Signifikanzniveaus an (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001)**

3.3.2. Verhaltenstestung

3.3.2.1. Korrespondierende Verschlechterung der Laufleistung

In allen Gruppen mit Applikation von Antikörpern gegen AQP4 kam es zu einer signifikanten Reduktion der relativen Laufleistungen unter forcierter Lokomotion. So kamen die Tiere in der letzten Testung nach insgesamt 15 (bzw.10) intrathekalen Injektionen nur noch auf 35,7% +/- 13,0 % (rAb^{AQP4} [1 mg/ml]), 39,7% +/- 19,7% (rAb^{AQP4} [0,5 mg/ml]), 30,2% +/- 8,2% (rAb^{AQP4} + hC), 43,3% +/- 13,4% (rAb^{AQP4_non_compl}) bzw. 40,9% +/- 9,2% (rAb^{AQP4_non_compl} + hC), während die Kontrollgruppen zum selben Zeitpunkt noch 103,5% +/- 12,6% (rAb^{Kontrolle1}) bzw. 98,4% +/- 25,5% (rAb^{Kontrolle1} + hC) und 78,0% +/- 19,9% (rAb^{Kontrolle2} + hC) des Werts der Baseline-Testung erreichten.

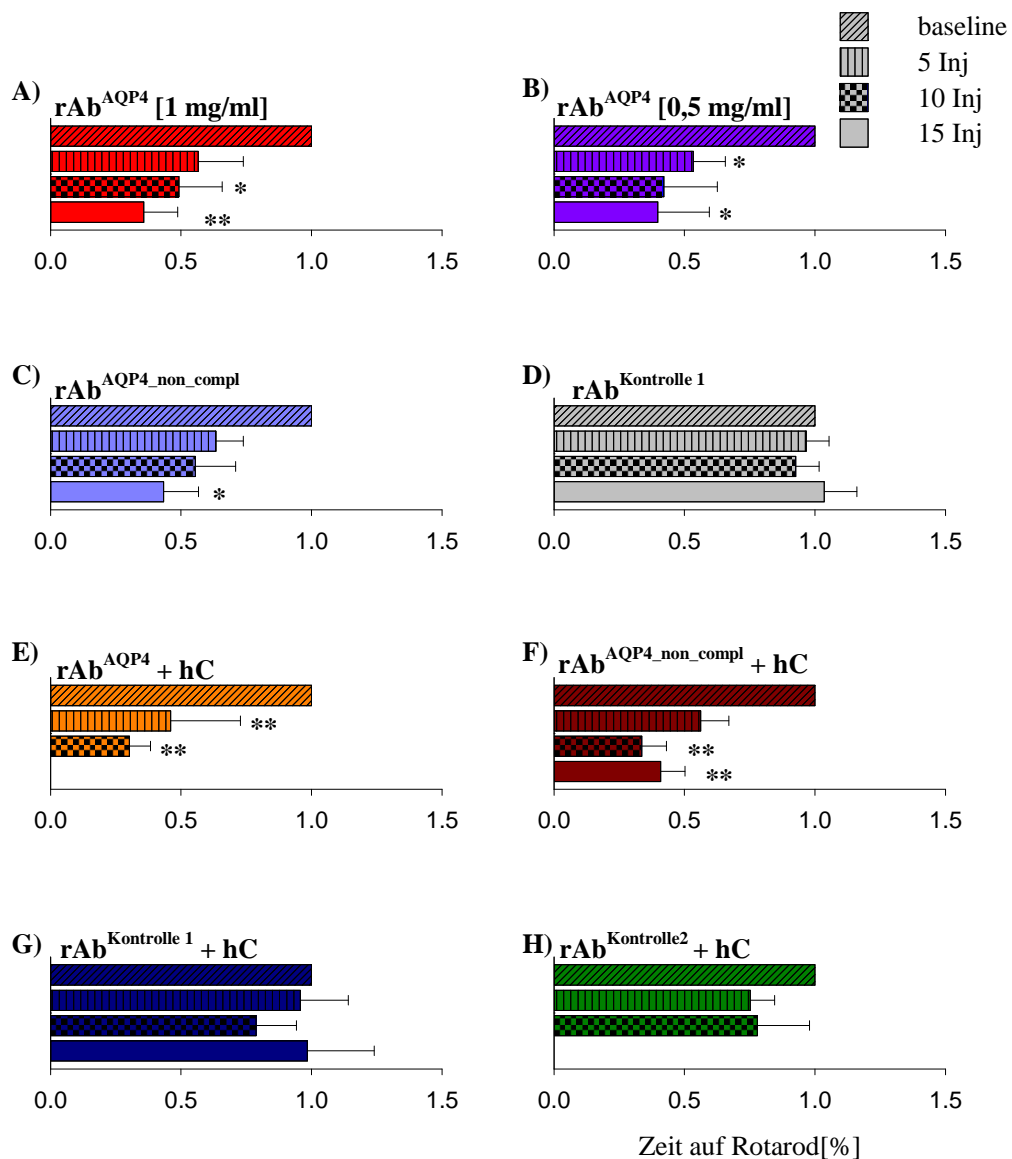


Abb. 29: Relative Laufleistung der Versuchsgruppen mit rekombinanten Antikörpern; alle Angaben relativ zum Durchschnitt der Baseline-Werte (100%), *p<0,05; **p<0,05

3.3.2.2. Keine Defizite der Vorderpfoten im GST

Es zeigten sich im Versuchsverlauf keine Auffälligkeiten bei der Testung der Kraft in den Vorderpfoten mittels Grip-Strength-Testung. So betrug die Kraft nach 15 (bzw. 10) Injektionen noch 84,5% +/- 18,9% (rAb^{AQP4} [1 mg/ml], 85,1% +/- 13,3 % (rAb^{AQP4} [0,5 mg/ml], 100,5% +/- 8,5% (rAb^{AQP4} +hC), 104,0% +/- 5,6% (rAb^{AQP4_non_compl} + hC), 115,1% +/- 8,8% (rAb^{AQP4_non_compl}) bzw. 106,0% +/- 12,6% (rAb^{Kontrolle1}), 102,9% +/- 7,3% (rAb^{Kontrolle1} + hC) und 117,1% +/- 14,7% (rAb^{Kontrolle2} + hC) der vor Injektionsbeginn gemessenen Werte. Dies ist konkordant mit der anzunehmenden Lokalisation der Läsionen im Rückenmark unterhalb des zerviko-thorakalen Niveaus in Höhe der Katheterendigung.

3.3.3. *Histologische Auswertung*

3.3.3.1. Geringe Anzahl an LVA in der Anti-Human-IgG-Färbung

Wie in 3.1.3 (vgl. auch Abb. 11) beschrieben, zeigen sich in der Anti-Human-IgG-Auswertung insbesondere der Gruppen mit rekombinanten Antikörpern und Komplement nur sehr wenige Strukturen, welche als "läsionsverdächtig" einzuschätzen sind und somit selektiv weiter untersucht werden konnten (z.B. rAb^{AQP4} + hC, rAb^{Kontrolle1} + hC; rAb^{AQP_non_compl} und rAb^{AQP_non_compl} + hC je n = 1). Auch weiter kranial oder kaudal geschnittene Gewebeproben weisen diese Strukturen nicht auf. Deswegen muss die histologische Analyse diesbezüglich vorsichtig interpretiert werden, Aussagen über signifikante Unterschiede können nicht getroffen werden. Infolgedessen erfolgt bei diesen Beispielen auch nur die Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Auswertung der histologischen Färbungen ohne statistische Analyse und aufgrund der geringen Fallzahl mit wenig Aussagekraft. Soweit mit diesen Einschränkungen beurteilbar, sind die morphologischen Befunde vergleichbar mit den in 3.2.4 anhand der mit Patienten-IgG behandelten Gruppen beschriebenen Läsionsmustern.

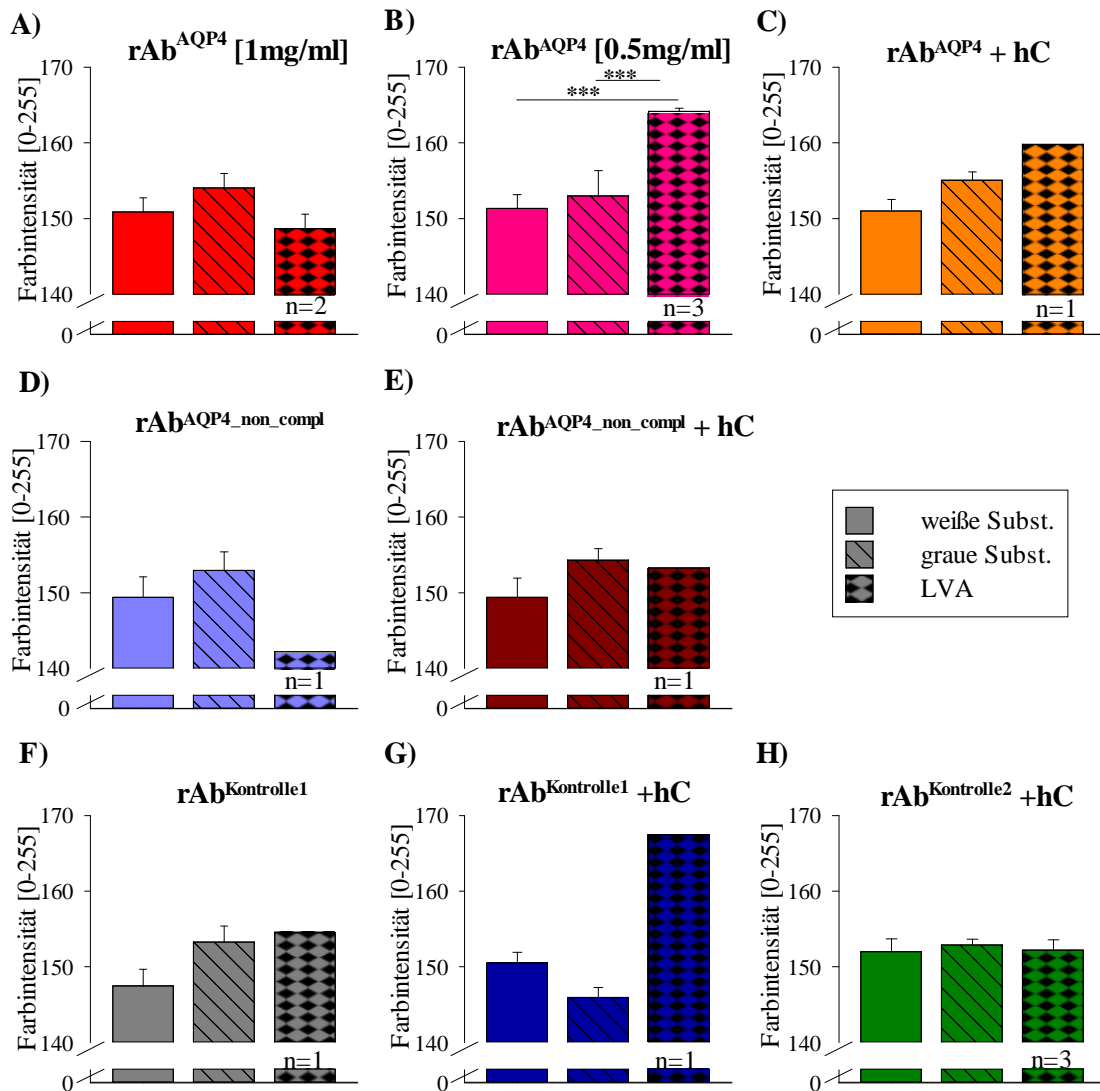


Abb. 30: Darstellung der anti-Human-IgG-Färbung der Gruppen mit rekombinanten Antikörpern; *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001**

3.3.3.2. Reduktion von Aquaporin 4

Infolgedessen besitzen auch die Ergebnisse der AQP4-Färbung in der Gruppenauswertung nur geringe Aussagekraft. In Einzelbeispielen ist allerdings klar eine Reduktion der AQP4-Expression auszumachen, die Tendenz einer AQP4-Depletion zeichnet sich in allen Gruppen ab. Die Werte der LVA im Vergleich zur korrespondierenden weißen Substanz sind mit 91,8 +/- 3,7 vs. 103,9 +/- 3,8 (rAb^{AQP4} [1mg/ml]), 95,6 +/- 15,5 vs. 108, 1 +/- 5,5 (rAb^{AQP4} [0,5mg/ml]), 76,8 vs 103,8 +/- 3,1(rAb^{AQP4} + hC), 96,1 vs. 106,1 +/- 3,6 (rAb^{AQP4}_non_compl) und 89,0 vs. 101,2 +/- 2,9 (rAb^{AQP4}_non_compl + hC) nominell

deutlich reduziert (Abb. 31), besitzen aber aufgrund der geringen Anzahl an LVA keine statistisch relevante Aussagekraft. In den Kontrollgruppen zeigen sich mit 98,8 +/- 10,3 vs. 102,3 +/- 3,7 (rAb^{Kontrolle1}), 91,4 vs. 100,8 +/- 1,7 (rAb^{Kontrolle1} + hC) bzw. 89,3 +/- 1,4 vs. 101,5 +/- 3,7 (rAb^{Kontrolle2} + hC) im Seitenvergleich vergleichbare Werte.

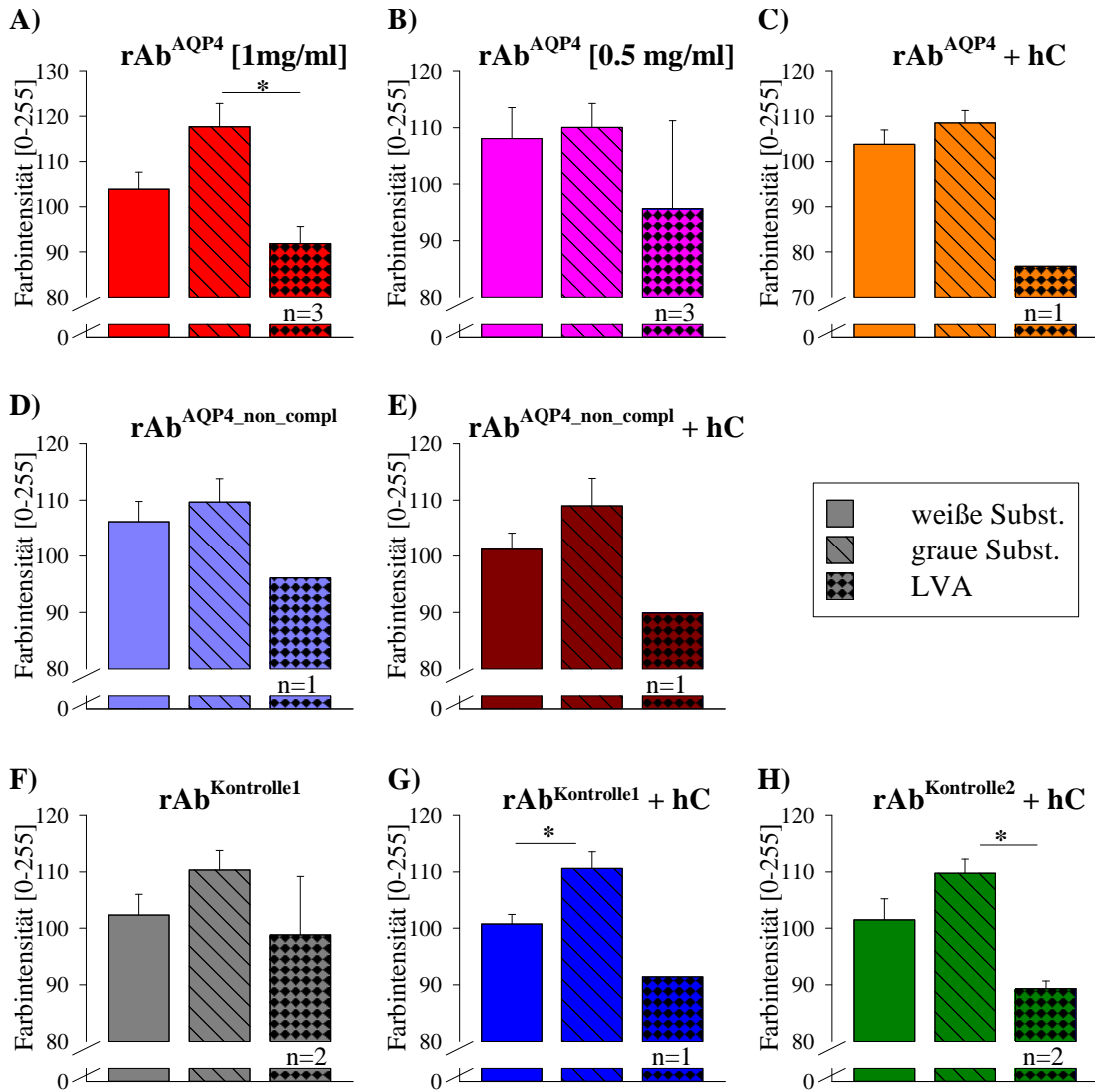


Abb. 31: Quantitative Auswertung der Aquaporin 4-Färbung der Gruppen mit rekombinanten Antikörpern, *p<0,05; **p<0,01

3.3.3.3. Auswertung der EAAT2-Färbung

Die graue Substanz der Schnitte ist stärker gefärbt als die weiße Substanz (Abb. 32). Die LVA zeigen bei geringer Stichprobenanzahl in den Gruppen rAb^{AQP4} [1mg/ml] mit 97,5 +/- 2,8 und rAb^{AQP4} + hC mit 102,9 signifikant reduzierte, in den übrigen Gruppen mit 102,7 +/- 2,7 (rAb^{AQP4} [0,5mg/ml]), 104,4 +/- 4,9 (rAb^{AQP4_non_compl}) und 110,2

(rAb^{AQP4_{non-compl}} + hC) graduell reduzierte EAAT2-Dichtewerte, während die LVA in den Kontrollgruppen mit 106,6 (rAb^{Kontrolle1}), 118,2 +/- 1,1 (rAb^{Kontrolle1} + hC) +/- und 112,4 +/- 4,3 (rAb^{Kontrolle2} + hC) keine signifikanten Differenzen zur weißen Substanz aufweisen.

Im Vergleich der Gruppen untereinander ist auffällig, dass bei identischer Färbereihe und gleichen Aufnahmeparametern in der Gruppe rAb^{AQP4} + hC im Vergleich zu der Kontrollgruppe rAb^{Kontrolle1} + hC (p<0,05) bzw. rAb^{AQP4} gegenüber rAb^{Kontrolle1} (p=0,063) eine generell reduzierte Immunreaktivität gemessen werden kann.

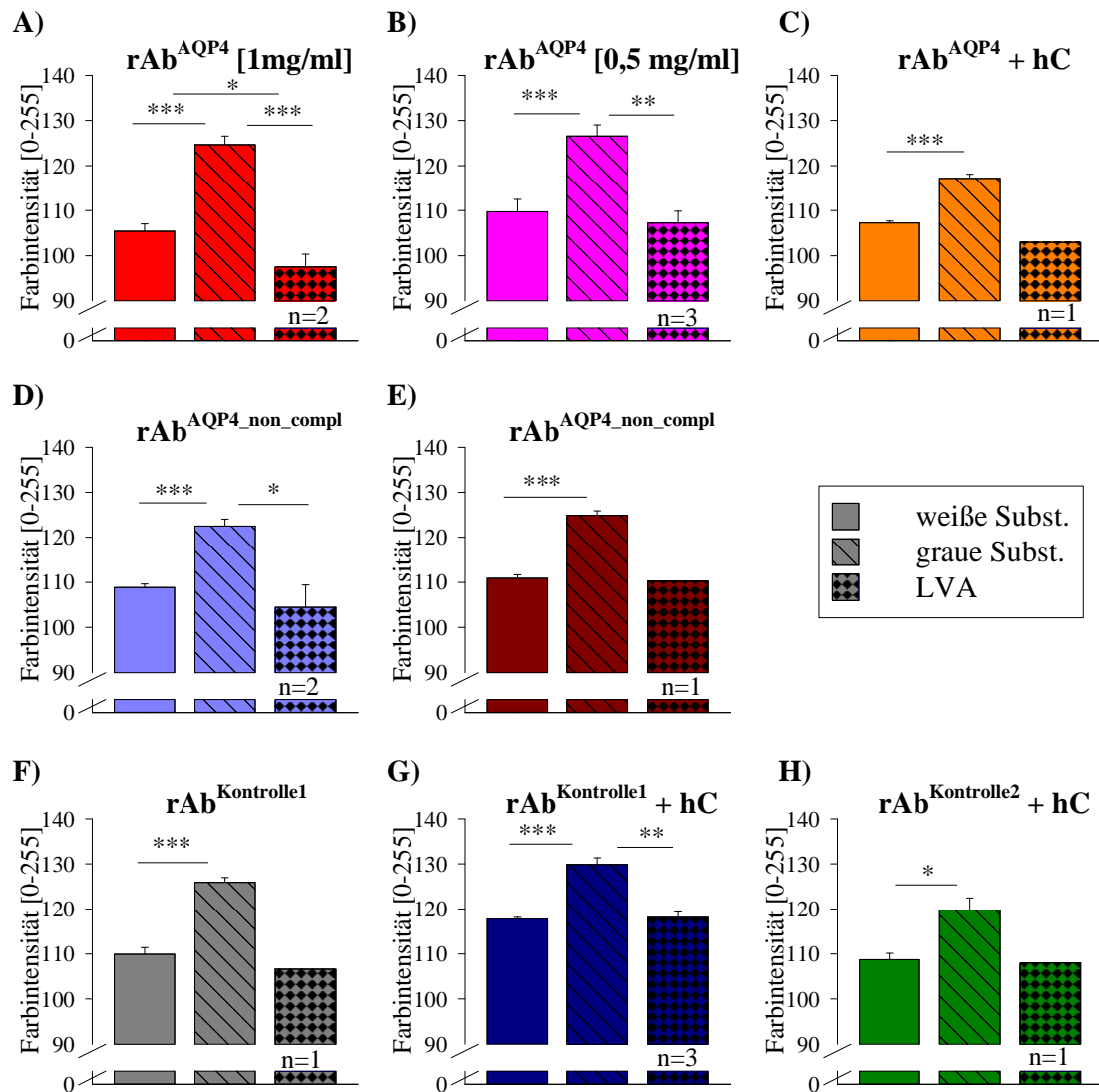


Abb. 32: Quantitative Auswertung der EAAT2-Färbung der Gruppen mit rekombinanten Antikörpern; *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001**

3.3.3.4. Auswertung der GFAP-Färbungen

In der GFAP-Färbung zeigt sich stets eine gering reduzierte Dichte in der LVA gegenüber der kontralateralen weißen Substanz. So betragen die Werte (jeweils LVA vs. weiße Substanz) 122,1 vs. 125,0 +/- 2,3 (rAb^{AQP4} [1mg/ml]), 117,1 +/- 4,2 vs. 124,9 +/- 1,1 (rAb^{AQP4} [0,5mg/ml]) 107,4 +/- 5,3 vs. 122,1 +/- 3,0 (rAb^{AQP4} + hC), 118,4 vs. 125,8 +/- 1,7 (rAb^{AQP4_non_compl}) und 111,4 +/- 5,7 vs. 121,4 +/- 3,2 (rAb^{AQP4_non_compl} + hC), während in den Kontrollgruppen mit 132,0 +/- 1,0 vs. 126,9 +/- 2,5 (rAb^{Kontrolle1}), 130,4 vs. 130,6 +/- 1,3 (rAb^{Kontrolle1} + hC) und 122,6 +/- 2,4 vs. 123,7 +/- 2,7 (rAb^{Kontrolle2} + hC) vergleichbare Werte zu beobachten sind. Interessanterweise zeigen die der LVA angrenzenden Bereiche der grauen Substanz gegenüber den übrigen Regionen der grauen

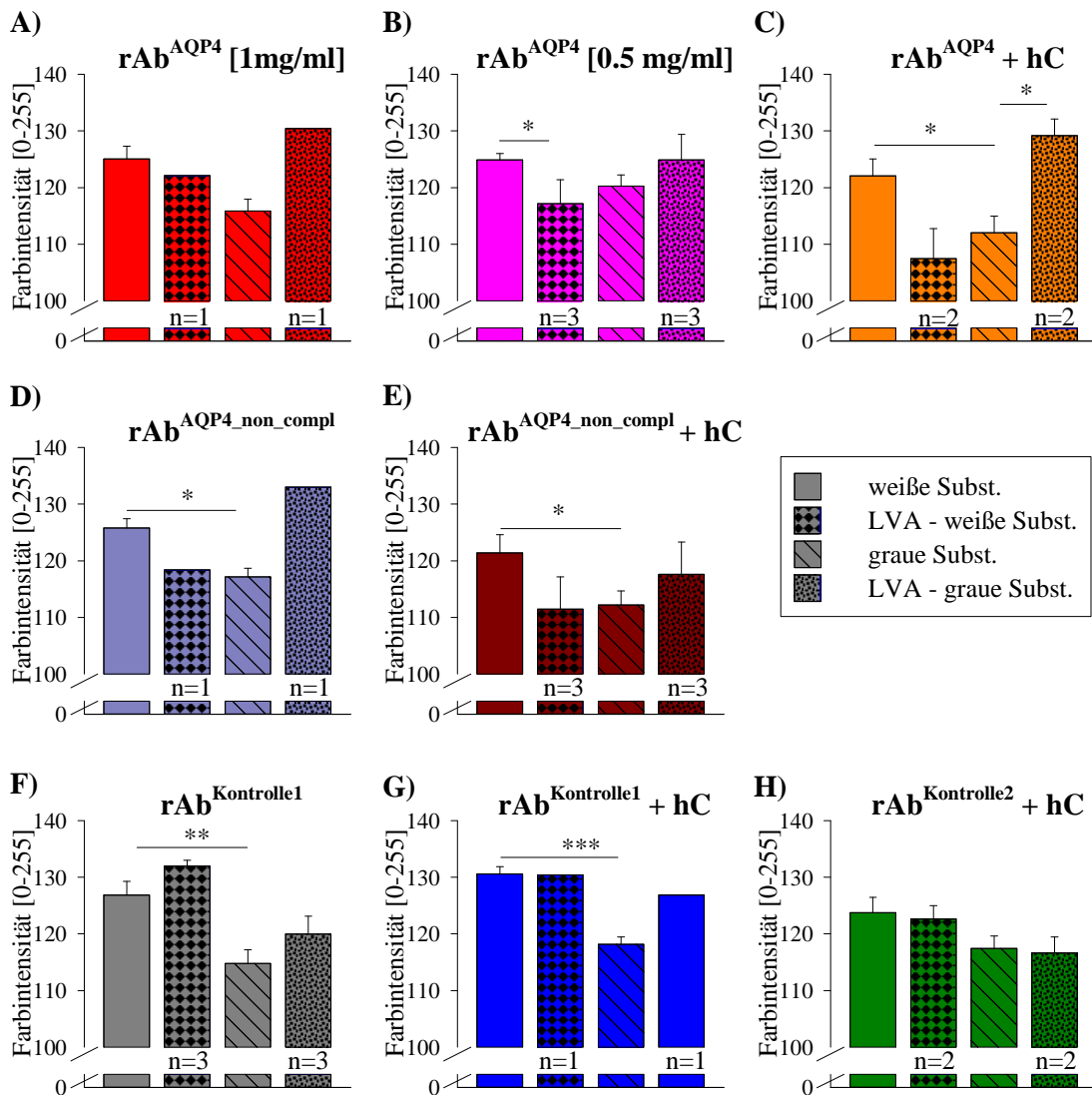


Abb. 33: Statistische Auswertung [Density(mean)] der Dichte der GFAP-Färbung der Gruppen mit rekombinanten Antikörpern; *p<0,05, **p<0,01; *p<0,001**

Substanz mit 130,4 (vs. 115,8 +/- 2,1, rAb^{AQP4} [1mg/ml]), 124,9 +/- 4,5 (vs. 120,2 +/- 2,0, rAb^{AQP4} [0,5mg/ml]), 129,2 +/- 2,9 (vs. 112,0 +/- 2,9, rAb^{AQP4} + hC), 133,0 (vs. 117,2 +/- 1,5 rAb^{AQP4_non_compl}) und 117,6 +/- 5,7 (vs. 112,6 +/- 2,4, rAb^{AQP4_non_compl} + hC) eine deutliche Erhöhung der GFAP-Reaktivität. (Abb. 33A - E). In den Kontrollgruppen (Abb. 33 F - H) ist diese Tendenz nicht zu beobachten, jedoch muss erneut auf die eingeschränkte Zahl an Schnitten mit auswertbaren LVA und die somit eingeschränkte Beurteilbarkeit hingewiesen werden.

Bei der Auswertung der Anzahl der Astrozyten fanden sich in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen der LVA und der korrespondierenden weißen Substanz (Abb. 34). In der grauen Substanz zeigt sich zwar in den an die LVA angrenzen-

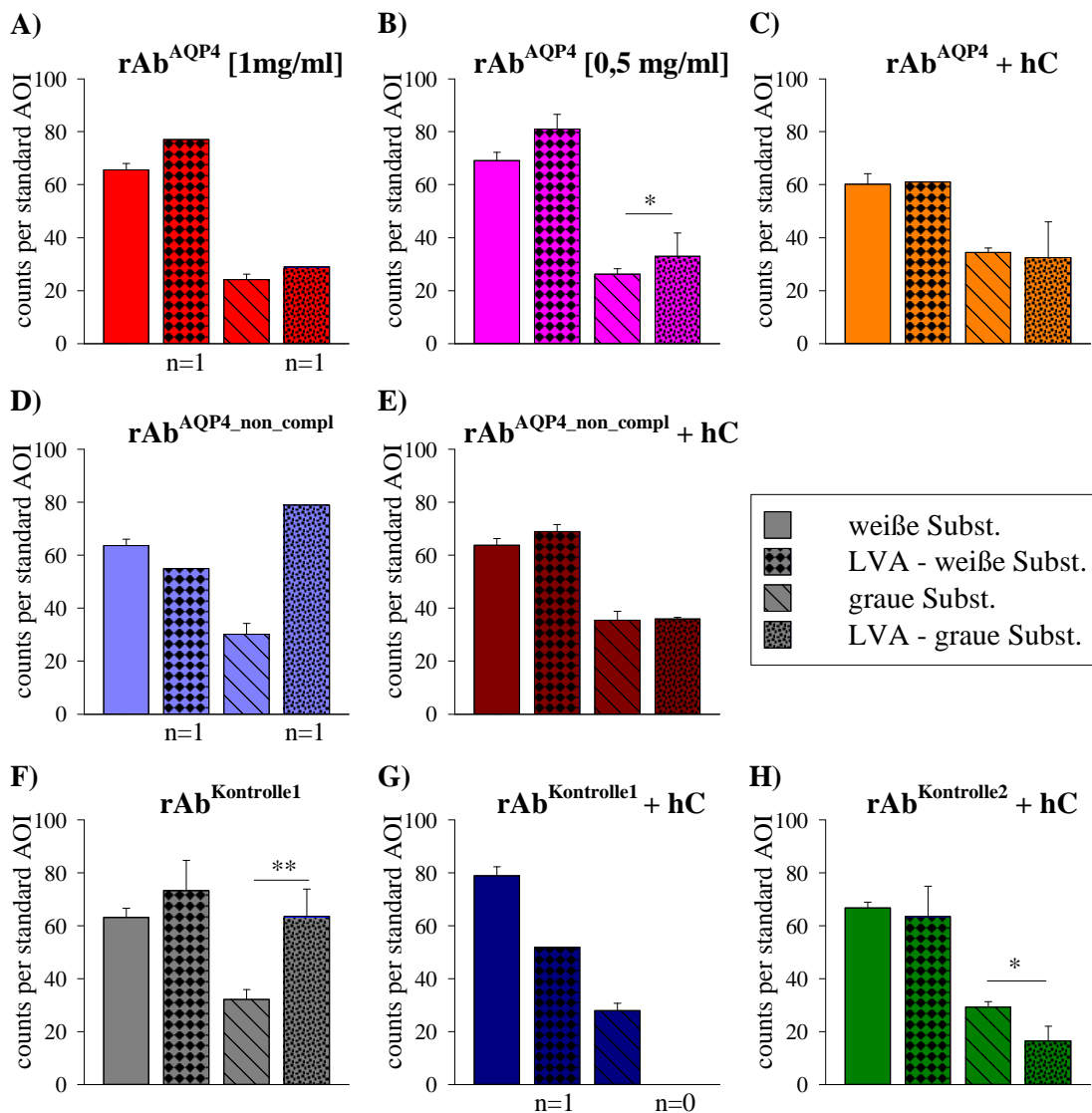


Abb. 34: Auswertung GFAP-Färbung der Gruppen mit rekombinanten Antikörpern, Anzahl der GFAP-reaktiven Strukturen pro Standard-AOI (62 μm^2). Es sind nur für die Fragestellung relevante Signifikanzen gekennzeichnet, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

den Arealen in den Gruppen rAb^{AQP4} [0,5mg/ml] (33,0 +/- 8,7 vs. 26,2 +/- 2,0) und rAb^{AQP4_non_compl} (79,0 vs. 30,2 +/- 4,0) eine im Vergleich zu den Durchschnittswerten in der grauen Substanz erhöhte Anzahl an GFAP-positiven Strukturen, eine ähnliche Tendenz lässt sich jedoch auch in der Kontrollgruppe rAb^{Kontrolle1} (63,7 +/- 10,2 vs. 32,1 +/- 2,7) beobachten, während andere NMO-Gruppen diese Tendenz nicht zeigen. Daher ist diese Beobachtung sehr inkonstant und eher der zu geringen Anzahl an auswertbaren LVA geschuldet.

In der Zusammenschau ist jedoch sicher festzustellen, dass keine der Gruppen eine massive Destruktion an GFAP-positiven Astrozyten zeigte, wie es in anderen Modellen nach Applikation von Antikörpern gegen AQP4 und Komplement beschrieben wird und in diesen Gruppen auch hier zu erwarten gewesen wäre.

3.3.3.5. Auswertung der Doppelfluoreszenz-Färbungen

Zur genaueren Lokalisation der AQP4- und EAAT2-Reduktion wurden jeweils Doppelfluoreszenzfärbungen gemeinsam mit GFAP angefertigt (Abb. 35 und Abb. 36).

Hierbei zeigt sich in den kontralateralen, nicht betroffenen Arealen (Abb. 35 C, E) eine klare Kolokalisation von AQP4 mit GFAP. In den LVA nahe dem Katheterende zeigt sich wie auch in den immunhistochemischen Färbungen ein selektiver Verlust von AQP4 bei erhaltener, z. T. sogar reaktiv verstärkter GFAP-Expression (Abb. 35 B, D).

EAAT2 ist in nicht-affizierten Bereichen ebenfalls mit GFAP kolokalisiert (Abb. 36C, E). Im Bereich der LVA ist hier auch wie beschrieben eine hochgradige Depletion bei erhaltenen astrozytären Strukturen auffällig (Abb. 36 B, D).

Interessanterweise erscheint die Fläche, welche einen Verlust an EAAT2 aufweist (exemplarisch in Abb. 36 A) deutlich ausgedehnter als die Areale, in welchen eine Depletion der AQP4-Reaktivität zu beobachten ist (exemplarisch Abb. 35 A). Diese Beobachtung widerspricht der bisherigen Annahme einer primären Internalisierung von AQP4/EAAT2-Komplexen und könnte Hinweis auf eine stärkere Beteiligung des EAAT2-Kanals und der hiermit verbundenen Theorie der Glutamatexzitotoxizität im Rahmen der Pathogenese der NMO sein.

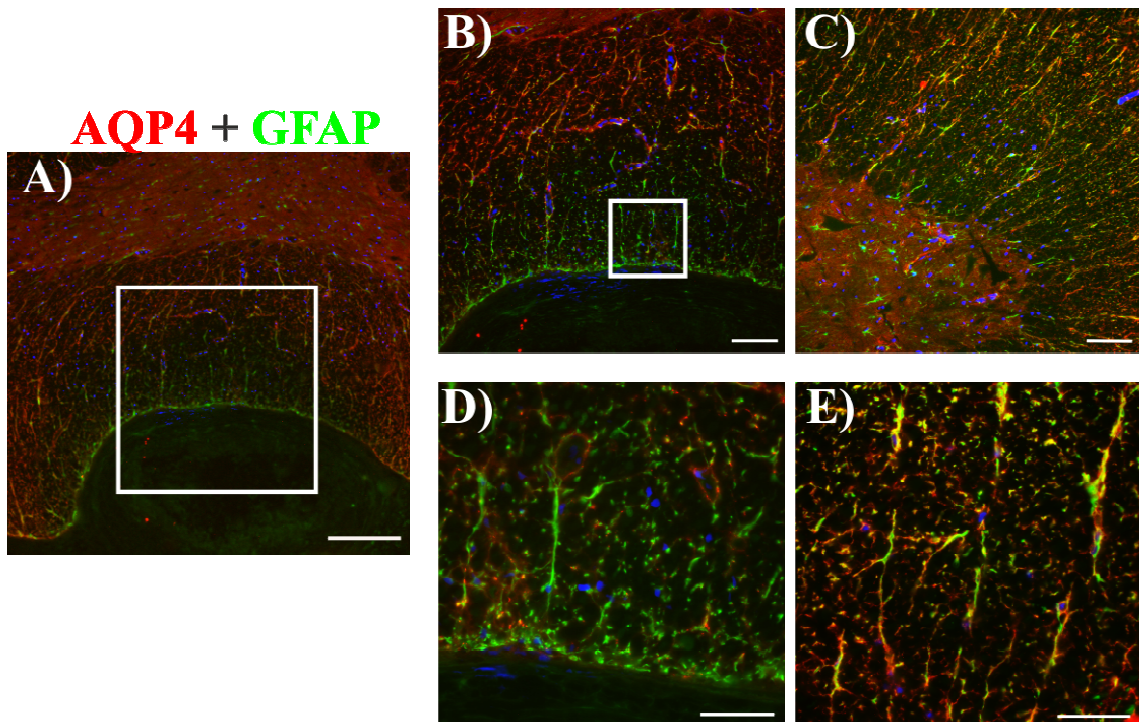


Abb. 35: Doppelfluoreszenz AQP4 (rot) + GFAP (grün) der Gruppe $rAb^{AQP4} + hC$, A) Übersicht im Bereich der LVA mit deutlicher Depletion von AQP4 bei erhaltenem GFAP, B) LVA Ausschnitt aus A), C) repräs. Ausschnitt der kontralat. Seite, D), E) Ausschnitte aus B, bzw. C); Skalierungsbalken A) 250 μ m (10-fach), B) + C): 100 μ m (20-fach), D) + E): 50 μ m (63-fach)

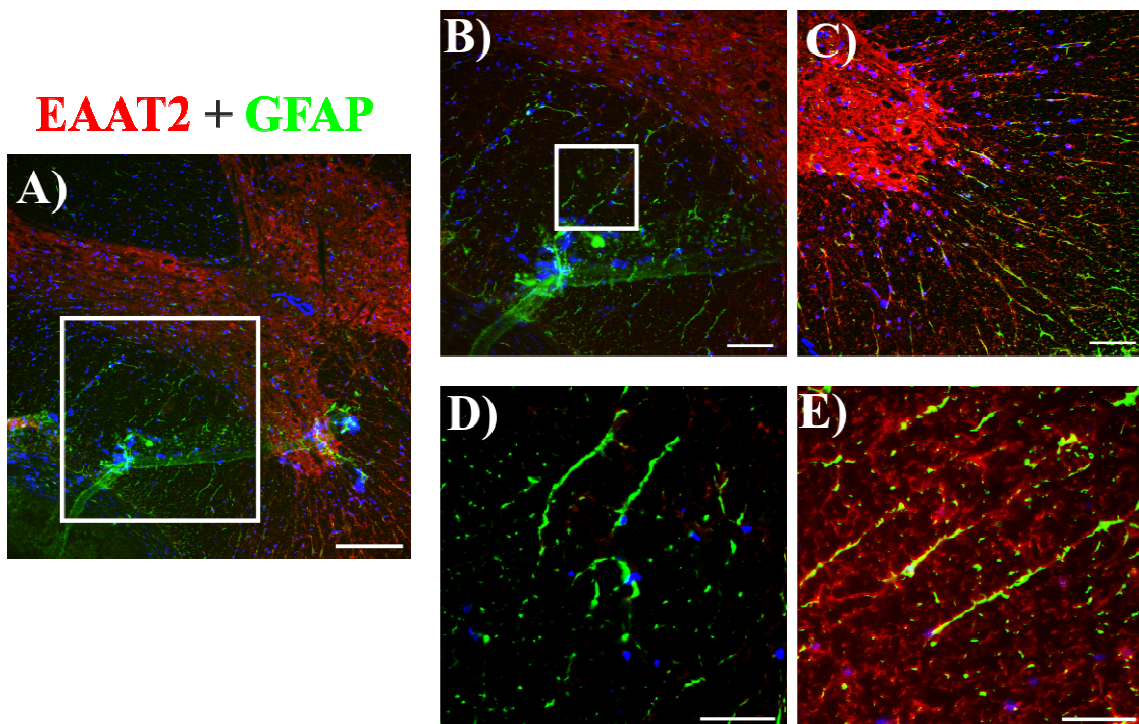


Abb. 36: Gruppe $rAb^{AQP4} + hC$; EAAT2 (rot) + GFAP (grün); A) Übersicht LVA mit deutlicher EAAT2-Deletion, B) LVA Ausschnitt aus A), C) repräsentativer kontralateraler Ausschnitt, D) + E) repräsentative Ausschnitte aus B) + C); Skalierungsbalken A): 250 μ m (10-fach), B) + C): 100 μ m (20-fach), D) + E): 50 μ m (63-fach)

3.3.3.6. Komplementablagerung und Zellinfiltration

In der C9neo-Färbung weisen die Gruppen mit Applikation von rekombinanten Antikörpern zusammen mit humanem Komplement parallel zu den Experimenten mit NMO-IgG (siehe 3.2.4.6) eine nur leichtgradige, vom Katheterende ausgehende Anfärbung der Rückenmarksschnitte auf (Abb. 37 A, B). Diese unterscheidet sich nicht wesentlich von der unspezifischen Farbreaktion der Gruppen ohne Komplement (Abb. 37 C, D).

In der ED1-Färbung ist hier in den LVA eine geringe lokale Infiltration an aktiven Makrophagen mit vereinzelt ED1-positiven Makrophagen zu erkennen, wobei ebenfalls vereinzelte Makrophagen disseminiert im Gewebe zu beobachten sind (Abb. 37 E, F). Die Gruppen ohne Applikation von Komplement zeigen keine Makrophageninfiltration (Abb. 37 G, H).

In der Zusammenfassung lässt sich feststellen, dass die Tiere mit Applikation von rAb^{AQP4} zwar weniger LVA zeigen, diese jedoch dieselben Charakteristika aufweist, wie bei Tieren nach Injektion von aufgereinigtem Patienten-Immunglobulin zusammen mit humanem Komplement (vgl. Beschreibung in 3.2.4.6 und 3.2.4.7).

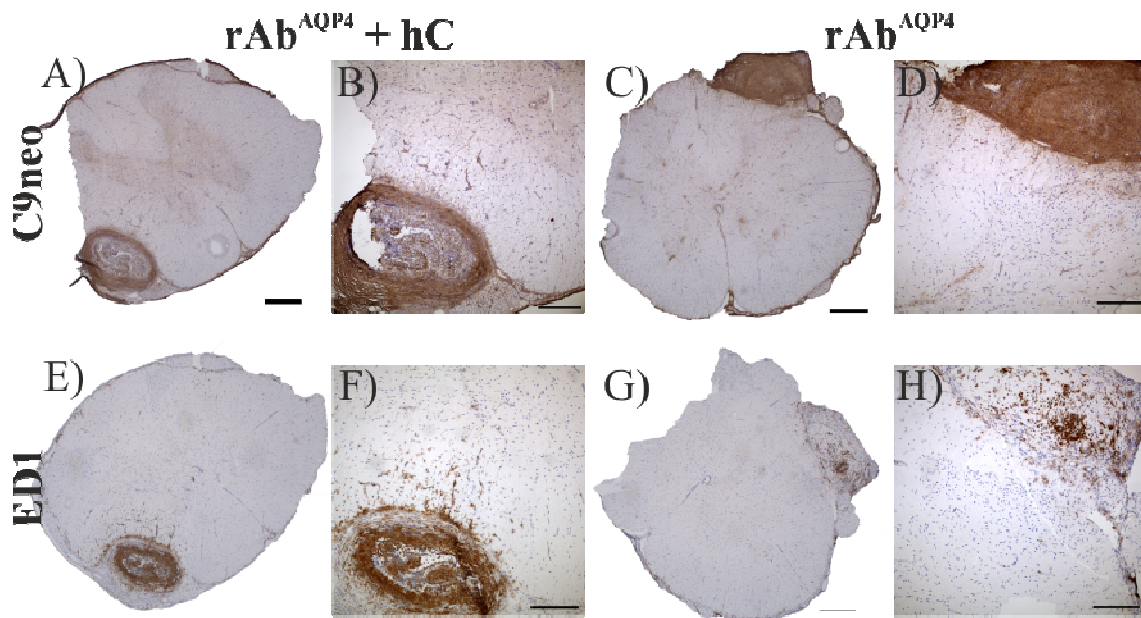


Abb. 37: C9neo (A - D) und ED1-Färbung (E - H) von rAb^{AQP4} mit (links) und ohne Komplement (rechts); Skalierungsbalken: A), C), E), G): 500 μ m (2,5-fach); B), D), F), H): 250 μ m (10-fach); jeweils Ausschnitt der LVA aus A), C), E), G).

3.4. Intrazerebrale Injektion von IgG mit aktivem Komplement

3.4.1. *Klinische Beobachtung*

Wie oben erwähnt, konnte nach Koinjektion von Antikörpern gegen AQP4 und aktivem humanem Komplement überraschenderweise nur eine leichtgradige intraspinale Aktivierung von Komplement im Bereich des gebundenen IgGs detektiert werden. Um die Frage zu klären, ob das aufgereinigte Patienten-IgG und die verwendete Komplementfraktion prinzipiell fähig sind, zusammen terminale Lysekomplexe zu bilden, wurde ein Kontrollexperiment mit direkter intrazerebraler Injektion der IgG-Präparationen und der Komplementfraktion durchgeführt. Hierzu wurden den Tieren das Kontroll-IgG Kontrolle 1, das Patienten-IgG NMO 2 sowie dieselben IgG-Fractionen zusammen mit dem humanen Komplement direkt intrazerebral injiziert (siehe Methoden).

Die Tiere hatten ein Ausgangsgewicht von 173,4 g +/- 2,1 g. Bei denjenigen Tieren, die im Laufe einer Woche 3 Injektionen erhielten, zeigte sich ein geringer, nicht gruppenspezifischer Gewichtsverlust auf ein finales Gewicht von 159,7 g +/- 3,6 g. Dies dürfte größtenteils auf den durch die 3-malige Operation mit begleitender Narkose verursachten Stress zurückzuführen sein. In der klinischen Beurteilung traten keine höhergradigen Auffälligkeiten auf, schon seit der ersten Injektion war in den Gruppen NMO 2 und NMO 2 + hC eine leichte Schwäche des Schwanzes (EAN-Score 1 - 2) sowie bei einem einzelnen Tier ein leicht ataktischer Gang (EAN-Score 2 - 3) zu beobachten, ohne dass es im weiteren Verlauf zu einer deutlichen Progression der Symptome kam. Die Kontrolltiere waren ohne Auffälligkeiten.

3.4.2. *Histologische Auswertung*

3.4.2.1. Ablagerungen von human-IgG an den Injektionsstellen

Analog zu den Katheterversuchen können läsionsverdächtige Areale durch die Anti-Human-IgG-Färbung identifiziert werden. Am vermuteten Injektionspunkt zeigt sich eine sehr starke Immunreaktivität gegen humanes Immunglobulin, davon ausgehend findet sich in abnehmender Intensität eine großflächige Infiltration der gesamten Hemisphäre (Abb. 38B). Kontralateral ist keine erhöhte Reaktivität vorhanden.

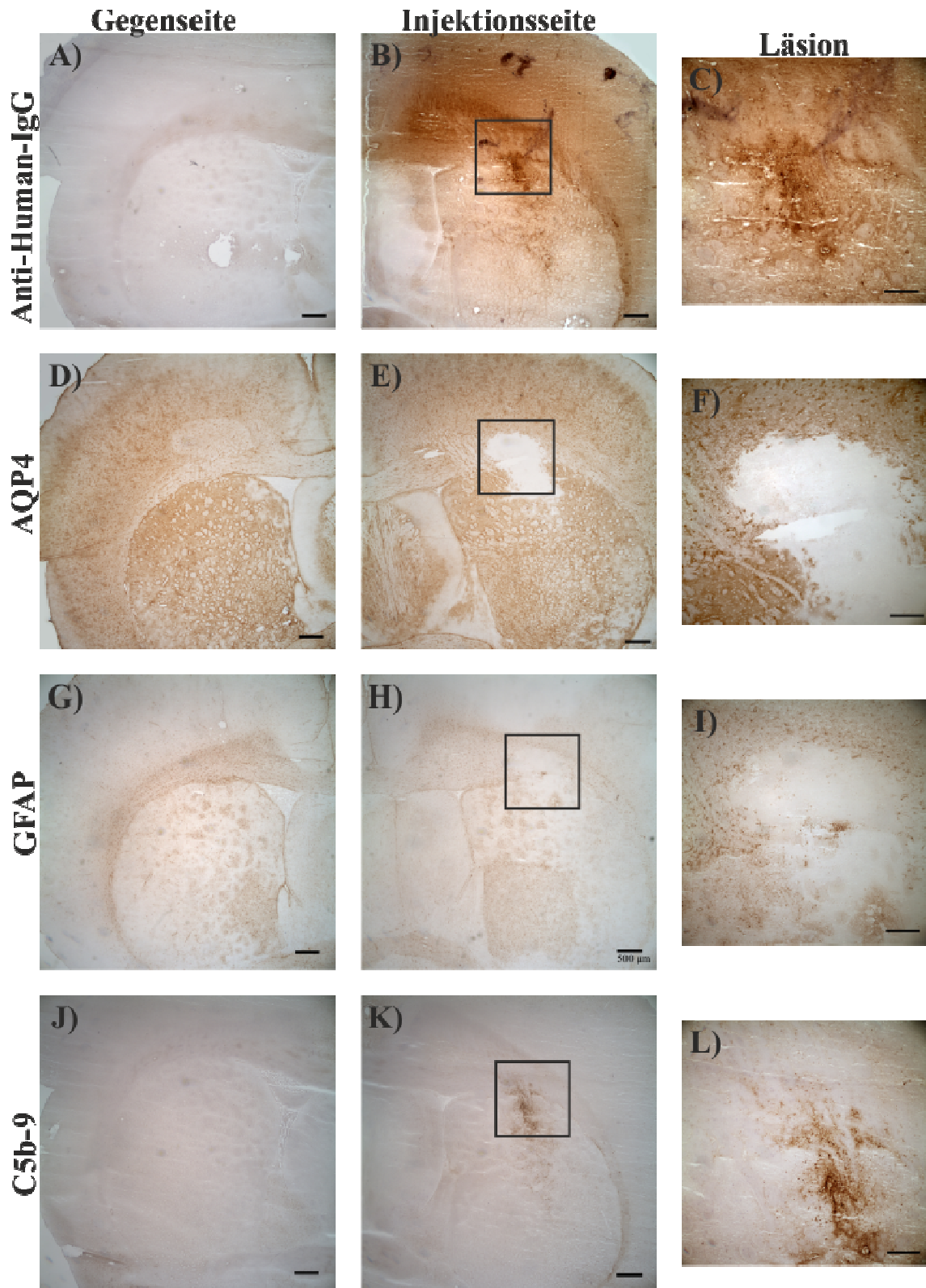


Abb. 38: Intrazerebrale Injektion von NMO2 + hC (1 x Injektion), Gegenseite (A, D, G, J) und Injektionsseite (B, E, H, K) im Vergleich (2,5-fache Vergrößerung, Skalierungsbalken je 500 μ m), Quadrate markieren Aufnahmeort der Läsion (C, F, I, L, je 10-fache Vergrößerung, Balken je 200 μ m)

Die Ratten mit 3-maliger Injektion hatten aufgrund der Gesamtmenge z. T. etwas stärkere und weiter verbreitete Farbinfiltrationen als jene Schnitte, bei welchen nach der ersten Injektion die Gewebeentnahme erfolgte.

3.4.2.2. Depletion von AQP4 und GFAP in Bereichen ausgeprägter Komplementaktivierung

In Versuchstieren mit intrazerebraler Applikation von NMO-IgG und additiver Gabe von humanem Komplement zeigt sich um den in der HE- und Anti-Human-IgG-Färbung identifizierten Injektionsort eine starke lokale Immunreaktion gegen C5b-9 (Abb. 38 J - L).

An diesen Stellen (Abb. 38 E, F) wird eine vollständige Depletion der AQP4-Immunoreaktivität beobachtet. Die Größe der Läsionen ist dabei auf die Orte der stärksten IgG-, sowie und C5b-9-Immunoreaktivität beschränkt. Ungleich zu den Befunden mit intrathekaler Injektion mit spinalen Kathetern kommt es in diesem Modell an den Läsionsorten zu einem deutlichen Verlust an GFAP-positiven Astrozyten. In der Kontrollgruppe zeigen sich um den Injektionsort keine Auffälligkeiten.

Das Experiment mit intrazerebraler Injektion zeigt, dass sowohl das verwendete NMO-IgG als auch das verwendete humane Komplement in der Lage ist, die in der Literatur vorbeschriebenen Läsionen hervorzurufen. Somit kann daraus geschlossen werden, dass das hier untersuchte Modell mit repetitiver intrathekaler Applikation von IgG zusammen mit humanem Komplement methodisch nicht für die Analyse Komplementvermittelter Prozesse im Rückenmark geeignet scheint.

4. DISKUSSION

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von NMO-IgG und rekombinanten Antikörpern gegen AQP4 sowie die Auswirkung von additivem humanem Komplement in einem intrathekalen passiv-Transfer-Modell der Ratte untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Applikation von Antikörpern zu progredienten motorischen Symptomen führt. Es fanden sich Hinweise auf eine Komplement-unabhängige Pathogenese, welche histologisch durch eine Hypertrophie GFAP-positiver Astrozyten und eine simultane Reduktion an Aquaporin 4 und EAAT2 gekennzeichnet war. Der Nachweis einer zusätzlich pathophysiologisch relevanten Rolle von humanem Komplement konnte in diesem Tiermodell mit repetitiver intrathekaler Applikation nicht erbracht werden. In einem separaten Versuchsteil wurde die bereits bekannte additive zytotoxische Wirkung von aktiviertem Komplement nach Bindung von anti-AQP4-Antikörpern im Gewebe nach direkter intraparenchymaler Injektion bestätigt.

4.2. Beurteilung des klinischen NMO-Scores und der Verhaltenstestungen

Die Entdeckung von spezifischen, gegen Aquaporin 4 gerichteten Autoantikörpern bei Patienten mit Neuromyelitis optica (Lennon et al., 2004; Lennon et al., 2005) sowie der Nachweis ihrer Beteiligung bei der Entstehung NMO-typischer Läsionen *in vitro* (Zhang et al., 2011; Hinson et al., 2012) und *in vivo* (Bennett et al., 2009; Bradl et al., 2009; Kinoshita et al., 2009; Saadoun et al., 2010; Ratelade et al., 2011) hat die Einordnung der Neuromyelitis optica als eigene Krankheitsentität ermöglicht. Die bisher etablierten Tiermodelle beruhen jedoch entweder auf einer Exazerbation vorbestehender, unphysiologischer Inflammation bei EAE (Bennett et al., 2009; Bradl et al., 2009; Kinoshita et al., 2009) oder weisen bei systemischer Applikation Limitationen bei der Überwindung der BHS auf (Kalluri et al., 2011; Ratelade et al., 2011). Das Tiermodell durch einmalige intrazerebrale Injektion hat den Nachteil, dass nicht das bei der NMO vorwiegend betroffene Rückenmark analysiert wird, und es erlaubt keine Beurteilung im zeitlichen Verlauf oder eine Evaluation der Effekte durch Verhaltensbeobachtungen (Saadoun et al., 2010; Ratelade et al., 2012).

Das in dieser Arbeit verwendete Modell mit repetitiver intrathekalen Applikation, welches zuvor schon bei anderen neurologischen Autoimmunerkrankungen mit Zieleepitopen im zentralen Nervensystem angewendet wurde (Geis et al., 2010; Geis et al., 2011; Geis et al., 2012), ermöglichte zum einen eine Überwindung der BHS ohne mögliche Interferenz durch eine generalisierte Entzündungsreaktion, zum anderen kann mit diesem Tiermodell die Wirkung der applizierten Antikörper über einen längeren zeitlichen Verlauf beurteilt werden.

Sowohl durch Applikation von aufgereinigtem Patienten-IgG als auch von rekombinanten AQP4-Antikörpern konnten klinische Symptome induziert werden, welche ausgehend von einer milden Gangunsicherheit und Schwäche des Schwanzes der Versuchstiere z. T. bis zu einer Paraparese der hinteren Extremitäten voranschritten und somit den klinischen Befunden einer Querschnittsmyelitis ähnelten. Dabei war diese Verschlechterung in allen Versuchsgruppen signifikant größer als in den entsprechenden Kontrollgruppen und das Fortschreiten progredient mit Phasen geringer Erholung an den injektionsfreien Tagen.

Die durch den NMO-Score veranschaulichte Progredienz der Symptome wird durch die Ergebnisse der Rotarod-Testung bestätigt. Unter forcierter Lokomotion erreichten zu Versuchsende sowohl die Gruppen mit Patienten-IgG (NMO1-4) als auch die verschiedenen Gruppen mit rekombinanten Antikörpern gegen AQP4 weniger als 50% des Ausgangswertes, während die Kontrollgruppen auf dem Niveau der Ausgangsleistungen blieben. Aufgrund der lumbalen Lage des Katheters waren die Ergebnisse des Grip-Strength-Tests ohne Kraftverlust der Vorderpfoten zu erwarten und entsprachen der spinalen Pathogenese mit lumbalem Schwerpunkt dieses Modells.

Durch die Verwendung von rekombinanten, spezifisch gegen Epitope von AQP4 gerichteten Antikörpern konnte die Spezifität der Antikörper-Wirkung belegt werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Symptome, sowohl im Hinblick auf den Schweregrad als auch auf den Zeitverlauf, ist anzunehmen, dass auch bei den polyklonalen IgG-Fractionen aus NMO-Patienten-Plasmapheresematerial die hochtitrig vorhandenen Antikörper gegen AQP4 für die Entstehung der charakteristischen Symptome verantwortlich sind.

Obwohl klinische Studien eine mögliche Korrelation zwischen AQP4-Titer und dem Schweregrad der Erkrankung gezeigt haben (Takahashi et al., 2007; Jarius et al., 2008) und die therapeutischen Ansätze der Plasmapherese oder Rituximab auf eine Reduktion des Immunoglobulinspiegels abzielen, wurde bisher lediglich *in vitro* nachgewiesen, dass NMO-IgG konzentrationsabhängig an AQP4 bindet und Effektorfunktionen ausübt (Ratelade et al., 2011). Die Beobachtung, dass in unserem Modell die um 50% reduzierte Konzentration von rAb^{AQP4} im Vergleich zur vollen Konzentration eine signifikant verringerte Pathologie bewirkt, ergänzt diese Beobachtungen erstmals in einem Tiermodell *in vivo*.

Ausgehend von histopathologischen Ablagerungen von aktiviertem Komplement in NMO-typischen Läsionsarealen (Lucchinetti et al., 2002; Misu et al., 2007) und einer Reduktion der NMO-Schubfrequenz durch den Komplement-depletierenden Antikörper Eculizumab (Pittock et al., 2013) wurde sowohl *in vitro* (Hinson et al., 2007; Kinoshita et al., 2009; Sabater et al., 2009; Zhang et al., 2011) als auch *in vivo* im Tiermodell nach EAE-Induktion und nach intrazerebraler Parenchyminjektion von NMO-IgG und humanem Komplement (Saadoun et al., 2010; Ratelade et al., 2012) die Beteiligung Komplement-abhängiger Zytotoxizität bei der Entstehung NMO-typischer Läsionen herausgestellt. Nach diesen experimentellen Befunden und den Beobachtungen in Autopsiestudien (Lucchinetti et al., 2002; Misu et al., 2006; Misu et al., 2007; Misu et al., 2013) besteht kein Zweifel, dass eine Antikörper-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems eine Hauptrolle bei der Entstehung der massiven Gewebsdestruktion bei Patienten mit NMO spielt. In dieser Arbeit konnte zusätzlich dargelegt werden, dass im Langzeitverlauf durch intrathekalen Passiv-Transfer Symptome sowohl durch Patienten-IgG (NMO-IgG) als auch durch rekombinante Antikörper (rAb^{AQP4}) ohne den Zusatz von humanem Komplement induziert werden können, die in den Kontrollgruppen nicht auftraten. Eine additive intrathekale Applikation von humanem Komplement (rAb^{AQP4} + hC, bzw. NMO1 + hC) führte lediglich zu einer geringen, nicht signifikanten Exazerbation der Symptome. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass die applizierten Antikörper lokales, über die BHS diffundiertes, Rattenkomplement aktivieren, jedoch erscheint dies aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich: Zunächst zeigen die C9neo-Färbungen histologisch keine verstärkte Komplementablagerung im Bereich der Bindung von humanem IgG. Darüber hinaus ist es fragwürdig, ob humane Antikör-

per überhaupt in der Lage sind, aus Ratten stammendes Komplement zu aktivieren, da Komplementaktivierung Spezies-spezifisch ist (Grundke-Iqbal et al., 1981; Lassmann et al., 1983; Sesarman et al., 2012). So wurde auch beschrieben, dass nur humanes, nicht jedoch murines Komplement in der Lage ist, in Zellkulturen gemeinsam mit NMO-IgG entsprechende Läsionen hervorzurufen (Saadoun et al., 2010). Ratten-Komplement scheint teilweise etwas stärker als Maus-Komplement in der Lage zu sein, mit humanen Antikörpern zu interagieren (Bergman et al., 2000; Asavapanumas et al., 2013). Dies dürfte allerdings in dem verwendeten Modell angesichts der geringen Komplementablagerung in den histologischen Befunden lediglich eine untergeordnete Rolle spielen.

Zur weiteren Kontrolle der Komplement-abhängigen Zytotoxizität erfolgten ebenfalls Versuche mit den modifizierten rekombinanten Antikörpern rAb^{AQP_{non}_compl}. Erwartungsgemäß zeigte das Komplement hier keinerlei additiven Effekt. Interessanterweise war die Erkrankungssymptomatik einerseits signifikant stärker gegenüber den Kontrollen, andererseits aber auch signifikant schwächer als bei der Applikation des Antikörpers ohne modifizierten F_c-Teil.

Durch die Substitution K322-A hat derart modifiziertes IgG wohl eine kaum veränderte Affinität zu dem Zielepitop, während die Fähigkeit zu Komplement-abhängiger Zytotoxizität (CDC) hochgradig reduziert ist. (Duncan und Winter, 1988; Hezareh et al., 2001; Li et al., 2010). Allerdings bestehen keine Vorbefunde, wie sich die Modifikation des F_c-Fragments auf die Auswirkung der Antikörperbindung im hier untersuchten Tiermodell auf mögliche nachfolgende Prozessierungswege auswirkt. Insbesondere veränderte sterische Eigenschaften oder unterschiedliche Glykosilierungen des F_c-Teils könnten die leichte, aber signifikant abgeschwächte Wirkung von rAb^{AQP₄_non_compl} gegenüber rAb^{AQP₄} erklären (Rademacher et al., 1994; Shields et al., 2002; Kaneko et al., 2006; Anthony et al., 2008). Der Effekt einer komplementunabhängigen, gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhten Pathogenität des Antikörpers rAb^{AQP₄_non_compl} liefert somit zusätzliche Hinweise auf eine Komplement-unabhängige Pathogenese.

Einer der möglichen alternativen Effektorwege ist die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (ADCC). Insbesondere für den verwendeten Antikörper rAb^{AQP_{non}_compl} wurde gezeigt, dass er in der Lage ist, ADCC zu aktivieren (Tradtrantip et al., 2012). Da bei einer K332A-Mutation prinzipiell eine Reduzierung der Fähigkeit zu ADCC auf ca.

50% beschrieben wurde (Hezareh et al., 2001), könnte die Beobachtung, dass die Pathogenität mit $rAb^{AQP_non_compl}$ geringer ist als mit rAb^{AQP4} und im Bereich des Schweregrades der halben Konzentration rAb^{AQP4} [0,5 mg/ml] liegt, hierauf zurückzuführen sein. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit keine Experimente in Hinblick auf ADCC durchgeführt wurden. In der histologischen Aufbereitung gab es keine offensichtlichen Hinweise auf eine Infiltration von NK-Zellen, allerdings wurde diesbezüglich keine qualitative oder quantitative Analyse durchgeführt. So sind auch andere Mechanismen wie eine durch Antikörper vermittelte Störung der Funktion des Membranproteins, z. B. in Form von Regulationsstörungen der Wasserhomöostase oder eine Antikörper-getriggerte Internalisierung des Zielantigens und eventuell assoziierter Proteine mit nachfolgender Funktionsstörung möglich.

4.3. Beurteilung der MRT-Bildgebung

In der klinischen Diagnostik der NMO spielen KM-aufnehmende, langstreckige Läsionen über mehrere Rückenmarkssegmente in der MRT-Bildgebung eine wesentliche Rolle (Filippi und Rocca, 2004; Trebst et al., 2013). In den durchgeführten MRT-Aufnahmen mit dem Kontrastmittel Gadofluorin M zeigte sich im Bereich des Katheterendes eine Kontrastmittelaufnahme in der Ausdehnung von 1 - 3 Segmenten, welche in Kontrolltieren nicht vorzufinden bzw. deutlich geringer ausgeprägt war. Da das verwendete Kontrastmittel sehr sensibel auf eine Störung der BHS reagiert (Bendszus et al., 2008; Weise und Stoll, 2012), ist das als Hinweis auf eine lokale Störung der BHS am Katheterende mit maximaler lokaler Konzentration des applizierten IgG zu werten. Die Funktion von AQP4 als hauptsächlichem Wasserkanal im zentralen Nervensystem und damit auch wichtigster Regulator im Bereich der BHS (Papadopoulos und Verkman, 2013) hat zu der Hypothese einer durch NMO-Antikörper verursachten lokalen endothelialen Dysfunktion geführt (Vincent et al., 2008). Die hier nachgewiesene lokale Störung der BHS könnte das Korrelat für eine Antikörper-induzierte Veränderung der AQP4-Funktion sein. Die fehlende Ausprägung der KM-Aufnahme in Tieren nach Applikation von Kontroll-IgG spricht gegen eine BHS-Dysfunktion durch eine lokale Reizung der Katheterspitze. Allerdings schränkt die geringe Anzahl der untersuchten Tiere sowie die z. T. erschwerte Auswertbarkeit durch Artefaktüberlagerung der Bilder die Verwertbarkeit der Ergebnisse ein. Weiterführende

Experimente, auch detaillierte histologische Untersuchungen der BHS in den Arealen der Antikörperablagerungen im Rückenmark der Versuchstiere könnten weitere interessante Details über Komplement-unabhängige Mechanismen von Antikörpern gegen AQP4 erbringen.

4.4. Beurteilung der histologischen Ergebnisse

Ein Hauptproblem der histologischen Auswertung lag in der z. T. geringen Anzahl an läsionsverdächtigen Arealen (LVA), insbesondere in den Gruppen mit rekombinanten Antikörpern. Während die Gruppen mit aufgereinigtem Patienten-IgG auch in den Kontrollgruppen eine hohe Anzahl an LVA aufwiesen, waren in den Gruppen mit rAbs sowohl Anzahl als auch Ausdehnung dieser Strukturen stark reduziert. Dies könnte an der gewählten Schnittebene des Rückenmarks liegen. Es wurde bei der Gewebeentnahme stets darauf geachtet, den Bereich des thorako-lumbalen Rückenmarkabschnitts für die anschließende Histologie zu nutzen, der unmittelbar an der Katheterspitze gelegen war. Die MRT-Untersuchungen hatten in diesem Bereich auch das Maximum der KM-Aufnahme gezeigt (siehe 4.3). Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass die exakte Schnittführung bei der Entnahme variierte und somit ggf. Läsionsareale nicht entsprechend angeschnitten wurden. Des Weiteren könnten die für die Experimente gewählten Konzentrationen der IgG-Präparationen eine Rolle spielen. Für die NMO-IgG-Fraktionen (NMO 1,2,4, Kontrolle 1,2) war eine Konzentration von 100 mg/ml, bzw. 12 mg/ml (NMO3) gewählt worden, während aufgrund der vermutlich höheren Spezifität bei den rAbs eine Konzentration von 1 mg/ml gewählt worden war. Es ist möglich, dass sich bei den Versuchsteilen mit aufgereinigten Patientenantikörpern mehr AQP4-reaktives IgG anlagert hat und somit histologisch detektiert werden konnte. Es ist zwar unwahrscheinlich, aber nicht vollends auszuschließen, dass sich in den aufgereinigten Patienten-Seren weitere unspezifisch mit anderen Epitopen des Rückenmark reagierende IgG-Fraktionen befunden und so zu einer erhöhten Anfärbung des gegen humanes Immunglobulin gerichteten Antikörpers beigetragen haben.

In den Versuchsgruppen mit aufgereinigtem Patienten-IgG aus Plasmapheresematerial demonstriert die regelhafte starke Reaktion der Anti-Human-IgG-Färbung, dass die Antikörper in hinreichend großer Menge das Gewebe erreicht haben. Auch in den Gruppen mit rekombinanten Antikörpern zeigten die Schnitte mit nachweisbaren Läsionsarealen

eine entsprechende Farbreaktion. Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass der Antikörper rAb^{AQP4} (alternative Bezeichnung rAb-53) bei systemischer Applikation in Anwesenheit von AQP4 eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 18$ h besitzt und bei intrazerebraler Injektion eine Diffusionsgeschwindigkeit im Gewebe von $6,2 \text{ mm}^2/3 \text{ h}$ zeigt (Ratelade et al., 2011; Asavapanumas et al., 2013). Somit ist auch in Anbetracht der phänotypischen Auffälligkeiten im Versuchsverlauf davon auszugehen, dass die applizierten Antikörper im Gewebe in hinreichend hoher Konzentration vorlagen.

4.4.1. Beurteilung der Färbungen gegen AQP4 und GFAP

In sämtlichen Versuchsgruppen mit intrathekaler Injektion von NMO-IgG oder anti-AQP4-reaktiven rAbs kam es im Bereich der LVA zu einer signifikanten oder zumindest tendenziellen Reduktion der AQP4-Reaktivität, welche mit den Orten der Ablagerung von humanem Immunglobulin korrelierte. Dieser Effekt zeigte sich nicht in den Kontrollgruppen. Es handelte sich hierbei um eine graduelle Reduktion und nicht um einen vollständigen Verlust von AQP4, wie er z.T. in histopathologischen Berichten (Misu et al., 2006; Misu et al., 2007; Roemer et al., 2007) und v. a. in experimentellen Studien nach intrazerebraler Injektion von NMO-IgG zusammen mit humanem Komplement (Saadoun et al., 2010; Ratelade et al., 2012) beschrieben wurde. Dieses Läsionsmuster ist klar unterschiedlich zu den Befunden nach intrathekaler Applikation und konnte hier in einem Kontrollexperiment mit intrazerebraler Ko-Injektion von NMO-IgG und humanem Komplement reproduziert werden. In dieser wahrscheinlich Komplement-abhängigen Läsionsform wurde neben der scharf begrenzten Auslöschung der AQP4-Immunreaktivität auch eine vollständige Depletion GFAP-positiver Astrozyten beobachtet. In den Versuchen mit chronischer intrathekaler Applikation zeigte sich eine tendenziell erhöhte Anzahl an Astrozyten bei gleichzeitig verringerter Gesamtdichte der GFAP-Färbung. In der angrenzenden grauen Substanz waren sogar sowohl Anzahl als auch Dichte teils signifikant erhöht. Morphologisch zeigten sich diese Astrozyten plumper, aufgequollen und mit vergrößerten Somata, sodass dieses Bild eventuell als reaktive Gliosis zu werten ist.

Dieses morphologische Erscheinungsbild mit unvollständiger AQP4-Depletion und reaktiver Hypergliosis lässt sich in eine Reihe neuerer Studien einordnen, die Hinweise auf eine weitere Komplement-unabhängige Pathologie gefunden haben: In histopatholo-

gischen Untersuchungen beschreiben beispielsweise Saji et al. in Gehirnschnitten im Anschluss an inflammatorische Regionen mit totaler GFAP- und AQP4-Depletion Regionen mit normaler bis reduzierter AQP4-Expression und erhöhter Anzahl GFAP-positiver Astrozyten, in welchen auch keine Komplementbeteiligung nachgewiesen werden konnte (Saji et al., 2013). Ebenso wurden in Rückenmarksschnitten von NMO-Patienten neben sogenannten "typischen" NMO-Läsionen mit massiver Komplementablagerung und vollständigem AQP4- und GFAP-Verlust auch Läsionstypen beschrieben, welche sich durch isolierten AQP4-Verlust oder partielle AQP4-Reduktion mit begleitenden hypertrophen Astrozyten (Clasmatodendrosis) auszeichnen (Misu et al., 2013). Auch in verschiedenen In-vitro-Studien (Hinson et al., 2008; Marignier et al., 2010; Hinson et al., 2012) fanden sich Hinweise auf eine Komplement-unabhängige Internalisierung von AQP4 und EAAT2 durch lysosomale Endozytose.

Weitere Beobachtungen legen nahe, dass dem Untergang von Gliazellen ein Verlust von AQP4 vorangeht (Asavapanumas et al., 2013; Misu et al., 2013). So wurde nach direkter intraparenchymaler Applikation von NMO-IgG eine "Penumbra" beschrieben, ein Areal mit isoliertem AQP4-Verlust ohne Komplementablagerung oder Veränderung der GFAP-Reaktivität, welches die Ausdehnung der "typischen Läsion" mit Komplementablagerung, GFAP-, und AQP4-Verlust weit überschritt (Asavapanumas et al., 2013). Auch in histopathologischen Rückenmarksschnitten von NMO-Patienten wurden Regionen selektiven AQP4-Verlusts beschrieben, welche an Läsionsareale mit Clasmatodendrosis angrenzten (Misu et al., 2013). Diese Theorie eines primären Verlusts an AQP4 mit nachfolgender Astrozytendestruktion kann in den hier durchgeführten Versuchen weder bestätigt noch widerlegt werden. Der lokale Verlust an AQP4 ist klar nachweisbar, die lokale Reaktion der Astrozyten mit hypertrophen Charakteristika und angrenzend tendenziell erhöhter GFAP-Reaktivität lässt verschiedene Deutungen zu: Einerseits kann es sich um nekrotische Vorformen des Zelluntergangs handeln, welche einer Depletion von AQP4 folgen. Andererseits ist es in diesem chronischen Modell auch denkbar, dass es sich um bereits neu gebildete, reaktive Astroglia in Form einer Narbenbildung handelt. Gerade der zeitliche Ablauf macht es schwer, unsere Ergebnisse mit anderen Studien zu vergleichen, da sowohl in vitro als auch in vivo die Effekte meist nach 24 h, spätestens aber nach 3 - 7 Tagen untersucht wurden. Längerfristige Veränderungen wurden bislang nicht evaluiert. Die hier gefundenen Ergebnisse könnten

charakteristische Veränderungen der Astrozyten aufzeigen, die durch chronisches Einwirken der Antikörper bedingt sind. Ob diese Antikörper-induzierten Veränderungen bei der Erkrankung der NMO eine pathophysiologische Rolle spielen, kann aus den Versuchen nicht direkt geschlossen werden.

4.4.2. Beurteilung der Färbung gegen EAAT2 und EAAT2-Hypothese

In den Bereichen des AQP4-Verlusts zeigte sich in den Gruppen mit NMO-Patienten-IgG sowie in den Gruppen rAb^{AQP4} [1 mg/ml] und rAb^{AQP4} + hC auch eine Depletion der EAAT2-Reaktivität. Der Umfang dieser Reduktion betraf mindestens die Ausdehnung des AQP4-Verlusts, teilweise war jedoch sogar noch ein deutlich größeres Areal betroffen.

Ausgehend von Beobachtungen, dass AQP4-defiziente Mäuse reduzierte Level an EAAT2-Transportern und verringerte Glutamat-Aufnahme aufweisen (Zeng et al., 2007), haben zwei Arbeitsgruppen in Zellkulturen mit primären Astrozyten oder transfizierten HEK 293-Zellen gezeigt, dass NMO-IgG in Abwesenheit von Komplementfaktoren neben einer Herabregulierung von AQP4 auch zu einer Reduktion von EAAT2 und einer veränderten Morphologie der Zellen führt (Hinson et al., 2008; Marignier et al., 2010). Der auf Astrozyten exprimierte Glutamattransporter EAAT2 ist für den weitaus größten Anteil der Wiederaufnahme von Glutamat im ZNS verantwortlich (Danbolt et al., 1992; Rothstein et al., 1996), eine Fehlfunktion führt zum Überschuss an synaptischem Glutamat und kann zu Exzitotoxizität führen (Sattler und Tymianski, 2001; Guo et al., 2003; Yi und Hazell, 2006; Lin et al., 2009; Kim et al., 2011). In beiden Zellkulturstudien wurde nach NMO-Inkubation eine veränderte Glutamat-Homöostase festgestellt, weswegen eine Antikörper-induzierte Verminderung der EAAT2-Expression ein zusätzlich möglicher Pathomechanismus sein könnte. Insbesondere der Verlust an Oligodendrozyten (Lucchinetti et al., 2002) könnte so erklärt werden, da diese hochsensibel auf Glutamatveränderungen reagieren (Matute et al., 2007). Als Effektorweg dieser Glutamatexzitotoxizität wurde u. a. auch eine Sensibilisierung der Oligodendrozyten gegenüber dem terminalen Komplementkomplex beschrieben (Alberdi et al., 2006). Inwieweit dieser Mechanismus bei der NMO einer Rolle spielen könnte, bleibt spekulativ. Insbesondere die Internalisierung des EAAT2/AQP4-Komplexes durch Antikörper gegen AQP4 ist derzeit in der Fachwelt umstritten, da

andere Gruppen diese Beobachtung mit primären Astrozyten nicht reproduzieren konnten (Ratelade et al., 2011). Außerdem könnten Veränderungen des Glutamatspiegels auch unabhängig von einer Internalisierung dieses Kanals durch den Untergang von Astrozyten bewirkt werden.

Die in den durchgeführten Experimenten gefundene Reduktion von EAAT2 in den Läsionsbereichen ist allerdings hochinteressant und kann nicht durch eine Depletion von Astrozyten erklärt werden. Diese Befunde sprechen für eine Interaktion von Antikörpern gegen AQP4 mit dem EAAT2-Kanal, indirekt über eine Assoziation von EAAT2 mit AQP4 oder über zusätzliche Signalwege, z.B. proinflammatorische Zytokine, die eventuell durch Astrozytenaktivierung im Gewebe hochreguliert werden. Diese Beobachtung konnte hier erstmals in In-vivo-Experimenten auch mit spezifischen rekombinanten Antikörpern gegen AQP4 belegt werden. Da EAAT2 noch in einem ausgedehnteren Areal als AQP4 selbst reduziert war, könnte dies sogar für eine stärkere Rolle sprechen als bisher angenommen. Die Rolle von extrazellulärem Glutamat und eine mögliche Exzitotoxizität lässt sich in diesen Experimenten nicht abschließend evaluieren, hier könnten weitergehende Untersuchungen, z.B. mit Mikrodialyse und funktioneller Charakterisierung der zentralen glutamatergen Transmission erfolgen.

4.5. Beurteilung der Applikation von humanem Komplement und Limitationen des Modells

Im Gegensatz zu den interessanten Befunden der Antikörper-induzierten Dysregulation von AQP4 und EAAT2 ist es hingegen fraglich, ob das verwendete Modell des intrathekalen Passiv-Transfers geeignet ist, die Rolle der CDC zu evaluieren. Sowohl in der Graduierung mittels des verwendeten Scores als auch bei der Analyse der quantitativen Laufleistung führte die zusätzliche Applikation von humanem Komplement nicht zu einer Exazerbation der durch Patienten-IgG oder durch rekombinante Antikörper induzierten Symptome (Ritter, 2013). In der histologischen Aufbereitung zeigte sich zwar in den Gruppen mit Komplement eine marginale Erhöhung der perivaskulären Immunreaktion für C9neo. Ebenso konnte bei zusätzlicher Applikation von hC nur eine geringe v. a. perivaskuläre Infiltration ED1-postiver Makrophagen festgestellt werden. In der Zusammenschau zeigte sich entgegen den Erwartungen nicht das charakteristische Bild einer Komplement-vermittelten Gewebsdestruktion, welches aus früheren

Experimenten mit aktiviertem Komplement und Autopsiestudien als sog. typische NMO-Läsionen bekannt ist (Lucchinetti et al., 2002; Misu et al., 2007; Saadoun et al., 2010). Als Positivkontrolle wurde eine direkt intraparenchymale Ko-Applikation von NMO-IgG mit aktivem humanem Komplement durchgeführt. Hierbei zeigte sich das typische Muster mit Aktivierung des terminalen Lysekomplexes, Destruktion der Astrozyten und Depletion von AQP4. Zusätzlich wurde die Aktivität des verwendeten Komplements durch ein externes Labor (Labor Prof. Seelig) in Routinetests bestätigt. Somit konnte sichergestellt werden, dass sowohl die Patienten-IgG-Fraktionen als auch das verwendete Komplement prinzipiell in der Lage sind, CDC zu initiieren.

Einerseits wäre es möglich, dass die kurzlebigen Komplementfaktoren zum Zeitpunkt der Applikation bereits inaktiviert waren. Bei den Versuchen mit intrathekaler Ko-Applikation war es mitunter notwendig, dass das Komplement bis zu 2 h aufgetaut war, ehe es dem letzten Tier der Versuchsgruppe injiziert werden konnte. Hier kann es theoretisch trotz zwischenzeitlicher Lagerung auf Eis zu einer Deaktivierung der Faktoren gekommen sein. Noch wahrscheinlicher ist es, dass sich das intrathekal applizierte Komplement schnell in Liquorraum verteilt und somit an den Orten der intramedullären NMO-IgG-Bindung in zu geringer Konzentration vorliegt, um in hinreichendem Umfang aktiviert zu werden. Dies würde den sehr geringen histologischen Nachweis von C9neo und nachfolgend die geringe zelluläre Infiltration erklären.

In der Zusammenschau der Befunde ist festzuhalten, dass in diesem Passiv-Transfer-Tiermodell die Komplementaktivierung eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Demzufolge gleichen sich die Befunde sowohl der phänotypischen Charakterisierung als auch der Histologie der Versuchsgruppen von NMO-IgG mit und ohne zusätzliche Komplementapplikation sowie der Versuchsreihen mit Applikation von mutierten rAbs, die nicht in der Lage sind, Komplement zu aktivieren. Die ermittelten Befunde sind somit wahrscheinlich auch in den Gruppen mit zusätzlicher Komplement-Injektion auf eine intrinsische, Komplement-unabhängige Wirkung der Antikörper gegen AQP4 zurückzuführen.

4.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Durch verschiedene pathologische Studien, klinische Erfahrungen mit Komplement-inhibierenden Substanzen und tierexperimentelle Befunde ist ausreichend belegt, dass eine Komplement-vermittelte Pathologie sicher die wesentliche Rolle bei der Gewebsdestruktion und Ausbildung der oft schwerwiegenden Symptome der NMO spielt. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine repetitive intrathekale Applikation von spezifischem IgG gegen AQP4 auch ohne Komplementaktivierung zu einer Myelonaffektion und zu einer Paraparese führen kann.

Inwiefern sich die Komplement-unabhängigen, Antikörper-induzierten Veränderungen der Membranexpression der hypertrophen Astrozyten mit Verminderung von AQP4 und EAAT2 auf die Wasserhomöostase oder den Glutamathaushalt auswirken und welche Bedeutung diese Prozesse dann für die Pathogenese der NMO haben, ist ein Ansatzpunkt für weitere Studien.

Die histologische Auswertung der beschriebenen Versuche beschränkte sich auf das Rückenmark, da hier die höchste lokale Antikörperkonzentration zu erwarten war. Dennoch wäre auch eine Aufarbeitung der entnommenen Großhirnareale sowie der v. a. klinisch auch typischerweise betroffenen Nn. optici interessant.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit die Erfahrung gemacht werden, dass sich die hier verwendete Methode einer intrathekalen Applikation von IgG-Frakturen zusammen mit aktivem Komplement aus experimentell-technischen Gründen nicht zur Analyse Komplement-vermittelter Pathomechanismen eignet. Dies muss für zukünftige Fragestellungen bedacht werden, wenn Antikörpereffekte im zentralen Nervensystem im Tiermodell untersucht werden sollen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In einem intrathekalen Passiv-Transfermodell der Ratte wurden die Auswirkungen von NMO-IgG aus Plasmapheresematerial und rekombinanten Antikörpern gegen AQP4 sowie der Effekt von additiver Applikation von humanem Komplement untersucht. NMO-IgG, rekombinante Antikörper und modifizierte Antikörper ohne Fähigkeit zur Aktivierung der Komplementkaskade waren bei repetitiver Applikation in der Lage, auch ohne additives humanes Komplement NMO-ähnliche progrediente motorische Symptome zu induzieren. Durch Ko-Injektion von humanem Komplement konnte keine signifikante Exazerbation der Pathologie bewirkt werden.

MRT-Studien zeigten lokale Schrankenstörungen am Ort der höchsten Antikörperkonzentration. In histologischen Aufarbeitungen von Rückenmarksschnitten zeigten sich lokale Deposition an humanem IgG, ein dazu korrelierender Verlust an AQP4 sowie eine darüber hinausgehende Reduktion an EAAT2, während GFAP-reaktive Astrozyten tendenziell hypertroph und vermehrt waren. Auch bei additiver Applikation von humanem Komplement wiesen die Läsionsareale im Gegensatz zu histopathologischen Befunden bei NMO-Patienten und anderen Tiermodellen nur eine geringe Ablagerung von aktivem Komplement und wenig Infiltration durch ED1-positive Makrophagen auf. Da in einem Kontrollexperiment mit intrazerebraler intraparenchymaler Applikation von NMO-IgG die beschriebene additive Zytotoxizität von humanem Komplement reproduziert werden konnte, erscheint die Verwendbarkeit des intrathekalen Modells zur Evaluation der Wirkung von humanem Komplement bei Autoimmunerkrankungen mit intraspinalen Zielepitopen nicht geeignet.

Die Ergebnisse lassen sich als Komplement-unabhängige intrinsische Wirkungen von Antikörpern gegen AQP4 deuten, die in einer Reduktion der Oberflächenexpression von AQP4 und EAAT2 resultieren und zu einer progredienten Myelopathie führen. Neben der bekannten Antikörper-induzierten Komplement-abhängigen Zytotoxizität könnten diese Effekte einen bislang nicht beschriebenen zusätzlichen Pathomechanismus bei der NMO darstellen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberdi, E., M. V. Sanchez-Gomez, I. Torre, M. Domercq, A. Perez-Samartin, F. Perez-Cerda und C. Matute (2006). "Activation of kainate receptors sensitizes oligodendrocytes to complement attack." J Neurosci 26(12): 3220-3228.
- Allbutt, T. (1870). "On the ophthalmoscopic signs of spinal disease." Lancet 95: 76-78.
- Amiry-Moghaddam, M. und O. P. Ottersen (2003). "The molecular basis of water transport in the brain." Nat Rev Neurosci 4(12): 991-1001.
- Anthony, R. M., F. Nimmerjahn, D. J. Ashline, V. N. Reinhold, J. C. Paulson und J. V. Ravetch (2008). "Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc." Science 320(5874): 373-376.
- Asavapanumas, N., J. Ratelade und A. S. Verkman (2013). "Unique neuromyelitis optica pathology produced in naive rats by intracerebral administration of NMO-IgG." Acta Neuropathol.
- Barkhof, F., M. Filippi, D. H. Miller, P. Scheltens, A. Campi, C. H. Polman, G. Comi, H. J. Ader, N. Losseff und J. Valk (1997). "Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis." Brain 120 (Pt 11): 2059-2069.
- Bedi, G. S., A. D. Brown, S. R. Delgado, N. Usmani, B. L. Lam und W. A. Sheremata (2011). "Impact of rituximab on relapse rate and disability in neuromyelitis optica." Mult Scler 17(10): 1225-1230.
- Bendszus, M., G. Ladewig, L. Jestaedt, B. Misselwitz, L. Solymosi, K. Toyka und G. Stoll (2008). "Gadofluorine M enhancement allows more sensitive detection of inflammatory CNS lesions than T2-w imaging: a quantitative MRI study." Brain 131(Pt 9): 2341-2352.
- Bennett, J. L., C. Lam, S. R. Kalluri, P. Saikali, K. Bautista, C. Dupree, M. Glogowska, D. Case, J. P. Antel, G. P. Owens, D. Gilden, S. Nessler, C. Stadelmann und B. Hemmer (2009). "Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica." Ann Neurol 66(5): 617-629.
- Bergman, I., P. H. Basse, M. A. Barmada, J. A. Griffin und N. K. Cheung (2000). "Comparison of in vitro antibody-targeted cytotoxicity using mouse, rat and human effectors." Cancer Immunol Immunother 49(4-5): 259-266.
- Bradl, M., T. Misu, T. Takahashi, M. Watanabe, S. Mader, M. Reindl, M. Adzemovic, J. Bauer, T. Berger, K. Fujihara, Y. Itoyama und H. Lassmann (2009). "Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo." Ann Neurol 66(5): 630-643.
- Buchwald, B., R. Ahangari, A. Weishaupt und K. V. Toyka (2002). "Intravenous immunoglobulins neutralize blocking antibodies in Guillain-Barre syndrome." Ann Neurol 51(6): 673-680.
- Burgoon, M. P., R. A. Williamson, G. P. Owens, O. Ghausi, R. B. Bastidas, D. R. Burton und D. H. Gilden (1999). "Cloning the antibody response in humans with inflammatory CNS disease: isolation of measles virus-specific antibodies from phage display libraries of a subacute sclerosing panencephalitis brain." J Neuroimmunol 94(1-2): 204-211.
- Carroll, M. V. und R. B. Sim (2011). "Complement in health and disease." Adv Drug Deliv Rev 63(12): 965-975.
- Crane, J. M., J. L. Bennett und A. S. Verkman (2009). "Live cell analysis of aquaporin-4 m1/m23 interactions and regulated orthogonal array assembly in glial cells." J Biol Chem 284(51): 35850-35860.

- Crane, J. M., C. Lam, A. Rossi, T. Gupta, J. L. Bennett und A. S. Verkman (2011). "Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays." J Biol Chem 286(18): 16516-16524.
- Cree, B. A., D. S. Goodin und S. L. Hauser (2002). "Neuromyelitis optica." Semin Neurol 22(2): 105-122.
- Danbolt, N. C., J. Storm-Mathisen und B. I. Kanner (1992). "An [Na⁺ + K⁺]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes." Neuroscience 51(2): 295-310.
- Devic, E. (1894). "Myélite subaigue compliquée de névrite optique." Bull Med (Paris) 8: 1033-1034.
- Devic, E. (1895). "Myélite aigue dorse-lombaire avec névrite optique, autopsie." Congrès francias de méd. Première Session, Lyon 1: 434-439.
- Duncan, A. R. und G. Winter (1988). "The binding site for C1q on IgG." Nature 332(6166): 738-740.
- Filippi, M. und M. A. Rocca (2004). "MR imaging of Devic's neuromyelitis optica." Neurol Sci 25 Suppl 4: S371-373.
- Gasque, P. und B. P. Morgan (1996). "Complement regulatory protein expression by a human oligodendrocyte cell line: cytokine regulation and comparison with astrocytes." Immunology 89(3): 338-347.
- Geis, C., B. Grunewald, A. Weishaupt, T. Wulsch, K. V. Toyka, A. Reif und C. Sommer (2012). "Human IgG directed against amphiphysin induces anxiety behavior in a rat model after intrathecal passive transfer." J Neural Transm 119(8): 981-985.
- Geis, C., A. Weishaupt, B. Grunewald, T. Wulsch, A. Reif, M. Gerlach, R. Dirx, M. Solimena, D. Perani, M. Heckmann, K. V. Toyka, F. Folli und C. Sommer (2011). "Human stiff-person syndrome IgG induces anxious behavior in rats." PLoS One 6(2): e16775.
- Geis, C., A. Weishaupt, S. Hallermann, B. Grunewald, C. Wessig, T. Wulsch, A. Reif, N. Byts, M. Beck, S. Jablonka, M. K. Boettger, N. Uceyler, W. Fouquet, M. Gerlach, H. M. Meinck, A. L. Siren, S. J. Sigrist, K. V. Toyka, M. Heckmann und C. Sommer (2010). "Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition." Brain 133(11): 3166-3180.
- Graber, D. J., M. Levy, D. Kerr und W. F. Wade (2008). "Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4." J Neuroinflammation 5: 22.
- Grundke-Iqbal, I., C. S. Raine, A. B. Johnson, C. F. Brosnan und M. B. Bornstein (1981). "Experimental allergic encephalomyelitis. Characterization of serum factors causing demyelination and swelling of myelin." J Neurol Sci 50(1): 63-79.
- Guo, H., L. Lai, M. E. Butchbach, M. P. Stockinger, X. Shan, G. A. Bishop und C. L. Lin (2003). "Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice." Hum Mol Genet 12(19): 2519-2532.
- Hartung, H. P., B. Schafer, K. Heininger, G. Stoll und K. V. Toyka (1988). The role of macrophages and eicosanoids in the pathogenesis of experimental allergic neuritis. Serial clinical, electrophysiological, biochemical and morphological observations. Brain. 111 (Pt 5): 1039-1059.
- Hezareh, M., A. J. Hessel, R. C. Jensen, J. G. van de Winkel und P. W. Parren (2001). "Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1." J Virol 75(24): 12161-12168.

- Hinson, S. R., A. McKeon, J. P. Fryer, M. Apiwattanakul, V. A. Lennon und S. J. Pittock (2009). "Prediction of neuromyelitis optica attack severity by quantitation of complement-mediated injury to aquaporin-4-expressing cells." Arch Neurol 66(9): 1164-1167.
- Hinson, S. R., A. McKeon und V. A. Lennon (2010). "Neurological autoimmunity targeting aquaporin-4." Neuroscience 168(4): 1009-1018.
- Hinson, S. R., S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, S. F. Roemer, J. P. Fryer, T. J. Kryzer und V. A. Lennon (2007). "Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica." Neurology 69(24): 2221-2231.
- Hinson, S. R., S. F. Roemer, C. F. Lucchinetti, J. P. Fryer, T. J. Kryzer, J. L. Chamberlain, C. L. Howe, S. J. Pittock und V. A. Lennon (2008). "Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2." J Exp Med 205(11): 2473-2481.
- Hinson, S. R., M. F. Romero, B. F. Popescu, C. F. Lucchinetti, J. P. Fryer, H. Wolburg, P. Fallier-Becker, S. Noell und V. A. Lennon (2012). "Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 109(4): 1245-1250.
- Ip, C. und H. Wiendl (2008). "Neuromyelitis optica." Akt Neurol 35: 450-462.
- Ip, V. H., A. Y. Lau, L. W. Au, F. S. Fan, A. Y. Chan, V. C. Mok und K. S. Wong (2013). "Rituximab reduces attacks in Chinese patients with neuromyelitis optica spectrum disorders." J Neurol Sci 324(1-2): 38-39.
- Jacob, A., M. Matiello, D. M. Wingerchuk, C. F. Lucchinetti, S. J. Pittock und B. G. Weinshenker (2007). "Neuromyelitis optica: changing concepts." J Neuroimmunol 187(1-2): 126-138.
- Jacob, A., B. G. Weinshenker, I. Violich, N. McLinskey, L. Krupp, R. J. Fox, D. M. Wingerchuk, M. Boggild, C. S. Constantinescu, A. Miller, T. De Angelis, M. Matiello und B. A. Cree (2008). "Treatment of neuromyelitis optica with rituximab: retrospective analysis of 25 patients." Arch Neurol 65(11): 1443-1448.
- Jarius, S., F. Aboul-Enein, P. Waters, B. Kuenz, A. Hauser, T. Berger, W. Lang, M. Reindl, A. Vincent und W. Kristoferitsch (2008). "Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica." Brain 131(Pt 11): 3072-3080.
- Jarius, S., D. Franciotta, F. Paul, K. Ruprecht, R. Bergamaschi, P. S. Rommer, R. Reuss, C. Probst, W. Kristoferitsch, K. P. Wandinger und B. Wildemann (2010). "Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance." J Neuroinflammation 7: 52.
- Jarius, S., K. Ruprecht, B. Wildemann, T. Kuempfel, M. Ringelstein, C. Geis, I. Kleiter, C. Kleinschnitz, A. Berthele, J. Brettschneider, K. Hellwig, B. Hemmer, R. A. Linker, F. Lauda, C. A. Mayer, H. Tumani, A. Melms, C. Trebst, M. Stangel, M. Marziniak, F. Hoffmann, S. Schippling, J. H. Faiss, O. Neuhaus, B. Ettrich, C. Zentner, K. Guthke, U. Hofstadt-van Oy, R. Reuss, H. Pellkofer, U. Ziemann, P. Kern, K. P. Wandinger, F. Then Bergh, T. Boettcher, S. Langel, M. Liebetrau, P. S. Rommer, S. Niehaus, C. Munch, A. Winkelmann, U. K. Zettl, I. Metz, C. Veauthier, J. P. Sieb, C. Wilke, H. P. Hartung, O. Aktas und F. Paul (2012). "Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients." J Neuroinflammation 9(1): 14.
- Jarius, S. und B. Wildemann (2012). "On the contribution of Thomas Clifford Allbutt, F.R.S., to the early history of neuromyelitis optica." J Neurol.

- Jarius, S. und B. Wildemann (2013). "Aquaporin-4 Antibodies (NMO-IgG) as a Serological Marker of Neuromyelitis Optica: A Critical Review of the Literature." Brain Pathol 23(6): 661-683.
- Jung, J. S., R. V. Bhat, G. M. Preston, W. B. Guggino, J. M. Baraban und P. Agre (1994). "Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance." Proc Natl Acad Sci U S A 91(26): 13052-13056.
- Kalluri, S. R., V. Rothhammer, O. Staszewski, R. Srivastava, F. Petermann, M. Prinz, B. Hemmer und T. Korn (2011). "Functional characterization of aquaporin-4 specific T cells: towards a model for neuromyelitis optica." PLoS One 6(1): e16083.
- Kaneko, Y., F. Nimmerjahn und J. V. Ravetch (2006). "Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation." Science 313(5787): 670-673.
- Kim, K., S. G. Lee, T. P. Kegelman, Z. Z. Su, S. K. Das, R. Dash, S. Dasgupta, P. M. Barral, M. Hedvat, P. Diaz, J. C. Reed, J. L. Stebbins, M. Pellecchia, D. Sarkar und P. B. Fisher (2011). "Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics." J Cell Physiol 226(10): 2484-2493.
- Kinoshita, M., Y. Nakatsuji, T. Kimura, M. Moriya, K. Takata, T. Okuno, A. Kumanogoh, K. Kajiyama, H. Yoshikawa und S. Sakoda (2009). "Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin." Biochem Biophys Res Commun 386(4): 623-627.
- Kinoshita, M., Y. Nakatsuji, T. Kimura, M. Moriya, K. Takata, T. Okuno, A. Kumanogoh, K. Kajiyama, H. Yoshikawa und S. Sakoda (2010). "Anti-aquaporin-4 antibody induces astrocytic cytotoxicity in the absence of CNS antigen-specific T cells." Biochem Biophys Res Commun 394(1): 205-210.
- Kinoshita, M., Y. Nakatsuji, M. Moriya, T. Okuno, A. Kumanogoh, M. Nakano, T. Takahashi, K. Fujihara, K. Tanaka und S. Sakoda (2009). "Astrocytic necrosis is induced by anti-aquaporin-4 antibody-positive serum." Neuroreport 20(5): 508-512.
- Kira, J. (2003). "Multiple sclerosis in the Japanese population." Lancet Neurol 2(2): 117-127.
- Lassmann, H., H. Stemberger, K. Kitz und H. M. Wisniewski (1983). "In vivo demyelinating activity of sera from animals with chronic experimental allergic encephalomyelitis. Antibody nature of the demyelinating factor and the role of complement." J Neurol Sci 59(1): 123-137.
- Lennon, V. A., T. J. Kryzer, S. J. Pittock, A. S. Verkman und S. R. Hinson (2005). "IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel." J Exp Med 202(4): 473-477.
- Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima und B. G. Weinshenker (2004). "A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis." Lancet 364(9451): 2106-2112.
- Li, Q., H. Ujiie, A. Shibaki, G. Wang, R. Moriuchi, H. J. Qiao, H. Morioka, S. Shinkuma, K. Natsuga, H. A. Long, W. Nishie und H. Shimizu (2010). "Human IgG1 monoclonal antibody against human collagen 17 noncollagenous 16A domain induces blisters via complement activation in experimental bullous pemphigoid model." J Immunol 185(12): 7746-7755.
- Lin, Y., G. Tian, K. Roman, C. Handy, J. B. Travers, C. L. Lin und R. L. Stephens, Jr. (2009). "Increased glial glutamate transporter EAAT2 expression reduces visceral nociceptive response in mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296(1): G129-134.

- Lucchinetti, C. F., R. N. Mandler, D. McGavern, W. Bruck, G. Gleich, R. M. Ransohoff, C. Trebst, B. Weinshenker, D. Wingerchuk, J. E. Parisi und H. Lassmann (2002). "A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica." Brain 125(Pt 7): 1450-1461.
- Marignier, R., A. Nicolle, C. Watrin, M. Touret, S. Cavagna, M. Varrin-Doyer, G. Cavillon, V. Rogemond, C. Confavreux, J. Honnorat und P. Giraudon (2010). "Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury." Brain 133(9): 2578-2591.
- Matsushita, T., N. Isobe, T. Matsuoka, T. Ishizu, Y. Kawano, T. Yoshiura, Y. Ohyagi und J. Kira (2009). "Extensive vasogenic edema of anti-aquaporin-4 antibody-related brain lesions." Mult Scler 15(9): 1113-1117.
- Matute, C., E. Alberdi, M. Domercq, M. V. Sanchez-Gomez, A. Perez-Samartin, A. Rodriguez-Antiguedad und F. Perez-Cerda (2007). "Excitotoxic damage to white matter." J Anat 210(6): 693-702.
- Matute, C., M. V. Sanchez-Gomez, L. Martinez-Millan und R. Miledi (1997). "Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 94(16): 8830-8835.
- Misu, T., K. Fujihara, A. Kakita, H. Konno, M. Nakamura, S. Watanabe, T. Takahashi, I. Nakashima, H. Takahashi und Y. Itoyama (2007). "Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis." Brain 130(Pt 5): 1224-1234.
- Misu, T., K. Fujihara, M. Nakamura, K. Murakami, M. Endo, H. Konno und Y. Itoyama (2006). "Loss of aquaporin-4 in active perivascular lesions in neuromyelitis optica: a case report." Tohoku J Exp Med 209(3): 269-275.
- Misu, T., R. Hoftberger, K. Fujihara, I. Wimmer, Y. Takai, S. Nishiyama, I. Nakashima, H. Konno, M. Bradl, F. Garzuly, Y. Itoyama, M. Aoki und H. Lassmann (2013). "Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica." Acta Neuropathol 125(6): 815-827.
- Morgan, B. P. und C. L. Harris (2003). "Complement therapeutics; history and current progress." Mol Immunol 40(2-4): 159-170.
- Murphy, K. P. (2012). Janeway's immunobiology, 8th edition, Garland Science, Taylor & Francis Group, London and New York.
- Neely, J. D., B. M. Christensen, S. Nielsen und P. Agre (1999). "Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels." Biochemistry 38(34): 11156-11163.
- Nicchia, G. P., L. Cogotzi, A. Rossi, D. Basco, A. Brancaccio, M. Svelto und A. Frigeri (2008). "Expression of multiple AQP4 pools in the plasma membrane and their association with the dystrophin complex." J Neurochem 105(6): 2156-2165.
- Nicchia, G. P., M. Mastrototaro, A. Rossi, F. Pisani, C. Tortorella, M. Ruggieri, A. Lia, M. Trojano, A. Frigeri und M. Svelto (2009). "Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies." Glia 57(13): 1363-1373.
- Nielsen, S., E. A. Nagelhus, M. Amiry-Moghaddam, C. Bourque, P. Agre und O. P. Ottersen (1997). "Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain." J Neurosci 17(1): 171-180.
- Owens, G. P., A. M. Ritchie, D. H. Gilden, M. P. Burgoon, D. Becker und J. L. Bennett (2007). "Measles virus-specific plasma cells are prominent in subacute sclerosing panencephalitis CSF." Neurology 68(21): 1815-1819.
- Papadopoulos, M. C. und A. S. Verkman (2013). "Aquaporin water channels in the nervous system." Nat Rev Neurosci 14(4): 265-277.

- Parratt, J. D. und J. W. Prineas (2010). "*Neuromyelitis optica: a demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes.*" Mult Scler 16(10): 1156-1172.
- Paty, D. W., J. J. Oger, L. F. Kastrukoff, S. A. Hashimoto, J. P. Hooge, A. A. Eisen, K. A. Eisen, S. J. Purves, M. D. Low, V. Brandeys und et al. (1988). "*MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT.*" Neurology 38(2): 180-185.
- Paul, F., S. Jarius, O. Aktas, M. Bluthner, O. Bauer, H. Appelhans, D. Franciotta, R. Bergamaschi, E. Littleton, J. Palace, H. P. Seelig, R. Hohlfeld, A. Vincent und F. Zipp (2007). "*Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica.*" PLoS Med 4(4): e133.
- Pittock, S. J., V. A. Lennon, K. Krecke, D. M. Wingerchuk, C. F. Lucchinetti und B. G. Weinshenker (2006). "*Brain abnormalities in neuromyelitis optica.*" Arch Neurol 63(3): 390-396.
- Pittock, S. J., V. A. Lennon, A. McKeon, J. Mandrekar, B. G. Weinshenker, C. F. Lucchinetti, O. O'Toole und D. M. Wingerchuk (2013). "*Eculizumab in AQP4-IgG-positive relapsing neuromyelitis optica spectrum disorders: an open-label pilot study.*" Lancet Neurol 12(6): 554-562.
- Rademacher, T. W., P. Williams und R. A. Dwek (1994). "*Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic.*" Proc Natl Acad Sci U S A 91(13): 6123-6127.
- Rash, J. E., T. Yasumura, C. S. Hudson, P. Agre und S. Nielsen (1998). "*Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord.*" Proc Natl Acad Sci U S A 95(20): 11981-11986.
- Ratelade, J., J. L. Bennett und A. S. Verkman (2011). "*Evidence against cellular internalization in vivo of NMO-IgG, aquaporin-4, and excitatory amino acid transporter 2 in neuromyelitis optica.*" J Biol Chem 286(52): 45156-45164.
- Ratelade, J., J. L. Bennett und A. S. Verkman (2011). "*Intravenous neuromyelitis optica autoantibody in mice targets aquaporin-4 in peripheral organs and area postrema.*" PLoS One 6(11): e27412.
- Ratelade, J., H. Zhang, S. Saadoun, J. L. Bennett, M. C. Papadopoulos und A. S. Verkman (2012). "*Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss.*" Acta Neuropathol 123(6): 861-872.
- Ritter, C. (2013). *Pathomechanismen von Antikörpern gegen Aquaporin 4 in einem Tiermodell für die Neuromyelitis optica.* Dissertation, Würzburg.
- Roemer, S. F., J. E. Parisi, V. A. Lennon, E. E. Benarroch, H. Lassmann, W. Bruck, R. N. Mandler, B. G. Weinshenker, S. J. Pittock, D. M. Wingerchuk und C. F. Lucchinetti (2007). "*Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis.*" Brain 130(Pt 5): 1194-1205.
- Rose, N. R. und C. Bona (1993). "*Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited).*" Immunol Today 14(9): 426-430.
- Rossi, A., J. Ratelade, M. C. Papadopoulos, J. L. Bennett und A. S. Verkman (2012). "*Neuromyelitis optica IgG does not alter aquaporin-4 water permeability, plasma membrane M1/M23 isoform content, or supramolecular assembly.*" Glia 60(12): 2027-2039.
- Rothstein, J. D., M. Dykes-Hoberg, C. A. Pardo, L. A. Bristol, L. Jin, R. W. Kuncl, Y. Kanai, M. A. Hediger, Y. Wang, J. P. Schielke und D. F. Welty (1996). "*Knockout of*

- glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate.* Neuron 16(3): 675-686.
- Saadoun, S., B. A. Bell, A. S. Verkman und M. C. Papadopoulos (2008). "Greatly improved neurological outcome after spinal cord compression injury in AQP4-deficient mice." Brain 131(Pt 4): 1087-1098.
- Saadoun, S., P. Waters, B. A. Bell, A. Vincent, A. S. Verkman und M. C. Papadopoulos (2010). "Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice." Brain 133(Pt 2): 349-361.
- Saadoun, S., P. Waters, C. MacDonald, B. A. Bell, A. Vincent, A. S. Verkman und M. C. Papadopoulos (2012). "Neutrophil protease inhibition reduces neuromyelitis optica-immunoglobulin G-induced damage in mouse brain." Ann Neurol 71(3): 323-333.
- Sabater, L., A. Giralt, A. Boronat, K. Hankiewicz, Y. Blanco, S. Llufríu, J. Alberch, F. Graus und A. Saiz (2009). "Cytotoxic effect of neuromyelitis optica antibody (NMO-IgG) to astrocytes: an in vitro study." J Neuroimmunol 215(1-2): 31-35.
- Saji, E., M. Arakawa, K. Yanagawa, Y. Toyoshima, A. Yokoseki, K. Okamoto, M. Otsuki, K. Akazawa, A. Kakita, H. Takahashi, M. Nishizawa und I. Kawachi (2013). "Cognitive impairment and cortical degeneration in neuromyelitis optica." Ann Neurol 73(1): 65-76.
- Sattler, R. und M. Tymianski (2001). "Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death." Mol Neurobiol 24(1-3): 107-129.
- Sesarman, A., E. Oswald, M. T. Chiriac, K. Csorba, V. Vuta, V. Feldrihan, A. Baican, L. Bruckner-Tuderman und C. Sitaru (2012). "Why human pemphigoid autoantibodies do not trigger disease by the passive transfer into mice?" Immunol Lett 143(1): 92-100.
- Shields, R. L., J. Lai, R. Keck, L. Y. O'Connell, K. Hong, Y. G. Meng, S. H. Weikert und L. G. Presta (2002). "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ3 and antibody-dependent cellular toxicity." J Biol Chem 277(30): 26733-26740.
- Shimizu, F., Y. Sano, T. Takahashi, H. Haruki, K. Saito, M. Koga und T. Kanda (2012). "Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier." J Neurol Neurosurg Psychiatry 83(3): 288-297.
- Sommer, C., A. Weishaupt, J. Brinkhoff, L. Biko, C. Wessig, R. Gold und K. V. Toyka (2005). "Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin." Lancet 365(9468): 1406-1411.
- Spiller, O. B., G. Moretto, S. U. Kim, B. P. Morgan und D. V. Devine (1996). "Complement expression on astrocytes and astrocytoma cell lines: failure of complement regulation at the C3 level correlates with very low CD55 expression." J Neuroimmunol 71(1-2): 97-106.
- Tait, M. J., S. Saadoun, B. A. Bell und M. C. Papadopoulos (2008). "Water movements in the brain: role of aquaporins." Trends Neurosci 31(1): 37-43.
- Takahashi, T., K. Fujihara, I. Nakashima, T. Misu, I. Miyazawa, M. Nakamura, S. Watanabe, Y. Shiga, C. Kanaoka, J. Fujimori, S. Sato und Y. Itoyama (2007). "Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre." Brain 130(Pt 5): 1235-1243.
- Toyka, K. V., D. B. Brachman, A. Pestronk und I. Kao (1975). "Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse." Science 190(4212): 397-399.
- Tradtrantip, L., H. Zhang, S. Saadoun, P. W. Phuan, C. Lam, M. C. Papadopoulos, J. L. Bennett und A. S. Verkman (2011). "Anti-Aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuromyelitis optica." Ann Neurol.

- Tradtrantip, L., H. Zhang, S. Saadoun, P. W. Phuan, C. Lam, M. C. Papadopoulos, J. L. Bennett und A. S. Verkman (2012). "Anti-aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuromyelitis optica." Ann Neurol 71(3): 314-322.
- Trebst, C., S. Jarius, A. Berthele, F. Paul, S. Schippling, B. Wildemann, N. Borisow, I. Kleiter, O. Aktas und T. Kumpfel (2013). "Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: Recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS)." J Neurol.
- Verkman, A. S. (2005). "More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins." J Cell Sci 118(Pt 15): 3225-3232.
- Verkman, A. S., D. K. Binder, O. Bloch, K. Auguste und M. C. Papadopoulos (2006). "Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice." Biochim Biophys Acta 1758(8): 1085-1093.
- Vincent, T., P. Saikali, R. Cayrol, A. D. Roth, A. Bar-Or, A. Prat und J. P. Antel (2008). "Functional consequences of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment." J Immunol 181(8): 5730-5737.
- Watanabe, S., I. Nakashima, T. Misu, I. Miyazawa, Y. Shiga, K. Fujihara und Y. Itoyama (2007). "Therapeutic efficacy of plasma exchange in NMO-IgG-positive patients with neuromyelitis optica." Mult Scler 13(1): 128-132.
- Weinstock-Guttman, B., C. Miller, E. Yeh, M. Stosic, M. Umhauer, N. Batra, F. Munschauer, R. Zivadinov und M. Ramanathan (2008). "Neuromyelitis optica immunoglobulins as a marker of disease activity and response to therapy in patients with neuromyelitis optica." Mult Scler 14(8): 1061-1067.
- Weise, G. und G. Stoll (2012). "Magnetic resonance imaging of blood brain/nerve barrier dysfunction and leukocyte infiltration: closely related or discordant?" Front Neurol 3: 178.
- Wingerchuk, D. M., W. F. Hogancamp, P. C. O'Brien und B. G. Weinshenker (1999). "The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome)." Neurology 53(5): 1107-1114.
- Wingerchuk, D. M., W. F. Hogancamp, P. C. O'Brien und B. G. Weinshenker (1999). "The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome)." Neurology 53(5): 1107-1107.
- Wingerchuk, D. M., V. A. Lennon, C. F. Lucchinetti, S. J. Pittock und B. G. Weinshenker (2007). "The spectrum of neuromyelitis optica." Lancet Neurol 6(9): 805-815.
- Wingerchuk, D. M., S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, V. A. Lennon und B. G. Weinshenker (2007). "A secondary progressive clinical course is uncommon in neuromyelitis optica." Neurology 68(8): 603-605.
- Wingerchuk, D. M. und B. G. Weinshenker (2003). "Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival." Neurology 60(5): 848-853.
- Witebsky, E., N. R. Rose, K. Terplan, J. R. Paine und R. W. Egan (1957). "Chronic thyroiditis and autoimmunization." J Am Med Assoc 164(13): 1439-1447.
- Xu, G. Y., S. Liu, M. G. Hughes und D. J. McAdoo (2008). "Glutamate-induced losses of oligodendrocytes and neurons and activation of caspase-3 in the rat spinal cord." Neuroscience 153(4): 1034-1047.
- Yaksh, T. L. und T. A. Rudy (1976). "Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space." Physiol Behav 17(6): 1031-1036.

- Yi, J. H. und A. S. Hazell (2006). "Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury." Neurochem Int 48(5): 394-403.
- Yu, X., D. H. Gilden, A. M. Ritchie, M. P. Burgoon, K. M. Keays und G. P. Owens (2006). "Specificity of recombinant antibodies generated from multiple sclerosis cerebrospinal fluid probed with a random peptide library." J Neuroimmunol 172(1-2): 121-131.
- Yu, X., M. Green, D. Gilden, C. Lam, K. Bautista und J. L. Bennett (2011). "Identification of peptide targets in neuromyelitis optica." J Neuroimmunol 236(1-2): 65-71.
- Zeng, X. N., X. L. Sun, L. Gao, Y. Fan, J. H. Ding und G. Hu (2007). "Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes." Mol Cell Neurosci 34(1): 34-39.
- Zhang, H., J. L. Bennett und A. S. Verkman (2011). "Ex vivo spinal cord slice model of neuromyelitis optica reveals novel immunopathogenic mechanisms." Ann Neurol 70(6): 943-954.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AOI	<i>area of interest</i>
AQP4	Aquaporin 4
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CIDP	chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EAAT2	Na ⁺ -abhängigen exzitatorischer Aminosäuren-Transporter 2
EAE	experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EAN	experimentelle Autoimmun-Neuritis
F _c	<i>fragment crystallisable</i>
FcγRIII	Fc-γ-Rezeptor Subtyp III
g	Gramm (Maßeinheit)
G	Gauge (Maßeinheit)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLT-1	Na ⁺ -abhängiger Glutamat-Transporter, Subtyp I
h	Stunde (Zeiteinheit)
hC	humanes Komplement
HEK-293	<i>human embryonic kidney cells</i>
IgG	Immunglobulin
IFNγ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IMP	<i>intramembrane particles</i>
i.th.	intrathekal
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
kg	Kilogramm (Maßeinheit)

KG	Körpergewicht
LVA	läsionsverdächtiges Areal
MBP	Myelin-basisches Protein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NaCl	0,9%-Natrium-Chlorid-Lösung
NK-Zellen	<i>natural killer-Zellen</i>
NMO	Neuromyelitis optica
OAP	<i>orthogonal arrays of particles</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
rAb	rekombinanter Antikörper
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sek.-AK	Sekundärantikörper
SEM	Standardfehler (Statistik)
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol.%	Volumenprozent
ZNS	zentrales Nervensystem

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer, für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken. Ihre Unterstützung sowie die rasche Erreichbarkeit bei Fragen und Problemen in jeder Phase des Projekts haben mir die Erstellung dieser Dissertation sehr erleichtert.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Anna-Lena Sirén für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christian Geis für die intensive Betreuung und die vielen Anregungen und Ideen im Verlauf des Projekts. Ohne seine Einführung in die verschiedenen experimentellen und wissenschaftlichen Methoden, seine ständige Erreichbarkeit und prompte Hilfestellung bei Problemen sowie die konstruktive Diskussion zur Weiterentwicklung der Untersuchungsansätze wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Lydia Biko und Frau Helga Brünner für die wertvollen Ratschläge beim Umgang mit den Versuchstieren sowie die Hilfe bei den Tierexperimenten und bei der Gewebeentnahme. Frau Barbara Dekant danke ich für die aufwendige Unterstützung beim Anfertigen der histologischen Schnitte und immunhistochemischen Färbungen.

Meinen Mitdoktoranden Christian Ritter und Christian Staudenmaier danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellungen bei den Operationen und der Durchführung der intrathekalen, bzw. intrazerebralen Tiermodelle.

Auch bei meinen Eltern möchte ich mich für die großzügige Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Christoph Ruschil
Adresse: Hainbuchenweg 3
72076 Tübingen
Geburtsdatum: 16. Juli 1986
Geburtsort: Weiden i. d. Opf.
Familienstand: ledig

Schulbildung

1993 - 1997 Grundschole in Weiden
1997 - 2006 Kepler-Gymnasium Weiden
06/2006 Abitur

Zivildienst

2006 - 2007 Malteser Hilfsdienst in Weiden, Schwerstbehindertenbetreuung

Hochschulausbildung

2007-2013 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
03/2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 01/2010 Promotionsarbeit in der Neurologischen Klinik und Poliklinik der
Universität Würzburg

Klinische Ausbildung

09/2009 Famulatur Kardiologie, Kliniken Nordoberpfalz AG, Weiden
08/2010 Famulatur Allgemein- und Viszeralchirurgie,
Universidad católica, Santiago de Chile
03/2011 Famulatur Radiologie, Praxis Dr. Helzel, Würzburg
09/2011 Famulatur Neurologie, Universitätsklinikum Würzburg

02/2012 - 03/2013 Medizinisch-praktisches Jahr

02/2012 - 06/2012 1. Tertial, Innere Medizin,
Verbundklinikum Rothenburg o. d. Tauber

06/2012 - 10/2012 2. Tertial, Neurologie,
Universitätsklinikum Würzburg

10/2012 - 12/2012 3. Tertial Chirurgie
Gefäß- und Neurochirurgie,
Royal Hospital, Melbourne

01/2013 - 03/2013 Unfall- und Allgemein Chirurgie,
McGill University, Montreal

seit 02/2014 Akademischer Mitarbeiter (Assistenzarzt) an der Neurologischen
Universitätsklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Tübingen, 02. April 2014

Christoph Ruschil